

**ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG**  
**TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA**  
**KHOA HÓA - BỘ MÔN CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM**  
**BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**GIÁO ÁN MÔN HỌC**  
**CÔNG NGHỆ DƯỠC PHẨM**  
**( 5 ĐƠN VỊ HỌC TRÌNH)**

**BIÊN SOẠN: GVC.TS. TRƯƠNG THỊ MINH HẠNH**

**ĐÀ NẴNG 2007**

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Văn Cách, *Công nghệ lên men các chất kháng sinh*, Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội 2005
- [2] Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyển, Phạm Văn Ty, *Vi sinh vật học*, Nhà xuất bản giáo dục 1997
- [3] Lê Văn Hiệp: *Vắcxin ho gà Miễn dịch và công nghệ*, Nhà xuất bản y học Hà Nội 2004
- [4] Bài giảng về kháng sinh, trường Đại học Dược Hà Nội
- [5] Erick j. Vandamme, Marcel Dekker, *Biotechnology of industrial Antibiotic*, Inc., New York 1984
- [6] McKane, Larry, McGraw-Hill, *Microbiology*, Inc. 1996
- [7] Harvey W. Blanch, Stephen Drew and Daniel I. C. Wan, *Comprehensive Biotechnology*, Pergamon Press, 1985
- [8] H.. Weide, J. Páca und W. A. Knorre., *Biotechnology*, VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 1987

## **NỘI DUNG CHƯƠNG TRÌNH**

### **PHẦN MỞ ĐẦU:**

#### **ĐẠI CƯƠNG VỀ KHÁNG SINH**

- 1.1. Giới thiệu lịch sử các chất kháng sinh.
- 1.2. Định nghĩa kháng sinh.
- 1.3. Đơn vị đo kháng sinh.
- 1.4. Phân loại kháng sinh.
- 1.5. Phương pháp định lượng kháng sinh.
- 1.6. Giá trị sử dụng điều trị của kháng sinh.
- 1.7. Chức năng sinh học của kháng sinh (cơ chế sinh kháng sinh).
- 1.8. Hiện tượng và bản chất của sự kháng thuốc.
- 1.9. Nguyên tắc điều hoà sinh tổng hợp kháng sinh.

## **PHẦN 2: CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT MỘT SỐ KHÁNG SINH**

### **CHƯƠNG 1: CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT PENICILLIN**

#### **1.1. Diêm lịch sử phát hiện và công nghệ sản xuất Penicillin.**

1.1.1. Diêm lịch sử ( phát hiện năm 1928; tinh chế thành công 1939; sản xuất công nghiệp 1940; lên men chìm penicillin G 1942; tinh chế được axit 6-aminopenicillanic 1959...)

1.1.2. Định nghĩa và công thức hoá học tổng quát của penicillin.

#### **1.2. Cơ sở công nghệ sinh tổng hợp penicillin.**

##### **1.2.1. Tuyển chọn chủng công nghiệp.**

**1.2.2. Cơ chế sinh tổng hợp penicillin ở nấm mốc *Penicillium chrysogenum*.**

##### **1.2.3. Phương pháp kiểm tra và định lượng penicillin.**

##### **1.2.4. Tác động của các thông số công nghệ đến quá trình lên men.**

- Sự phát triển hệ sợi và đặc điểm hình thái sợi.
- Đặc tính nhiệt động của dịch lên men.
- Thành phần môi trường lên men.
  - Điều kiện tiến hành lên men (nhiệt độ, pH, oxy, khuấy trộn, CO<sub>2</sub>).

#### **1.3. Qui trình sản xuất penicillin công nghiệp.**

\* Đặc điểm chung của qui trình ( 4 công đoạn: Lên men, tinh chế, sản xuất các chế phẩm bán tổng hợp, sản xuất thuốc Penicillin bán tổng hợp.

#### **1.4. Lên men**

1.4.1. Chuẩn bị lên men ( nhân giống, chuẩn bị môi trường và thiết bị...).

1.4.2. Các kỹ thuật lên men ( gián đoạn, bán liên tục, đặc điểm về thiết bị...).

1.4.3. Hiệu quả kinh tế chung của quá trình lên men.

### **1.5. Xử lý dịch lên men và tinh chế thu penicillin.**

1.5.1. Lọc .

1.5.2. Trích ly.

1.5.3. Tẩy màu.

1.5.4. Kết tinh và sấy thu penicillin tự nhiên.

### **1.6. Sản xuất các chế phẩm beta-lactam bán tổng hợp từ penicillin G.**

1.6.1. Nhu cầu sản xuất chế phẩm bán tổng hợp.

- Cơ chế tác dụng.

- Sự kháng thuốc và hướng giải quyết.

- Mở rộng đặc tính và hiệu quả điều trị cho chế phẩm.

#### **1.6.2. Sản xuất 6 - APA và sản xuất các penicillin bán tổng hợp.**

- Sản xuất 6- AP A (phương pháp hoá học, phương pháp enzym).

- Sản xuất penicillium bán tổng hợp (Phương pháp hoá học, phương pháp enzym)

#### **1.6.3. Sản xuất các cephalosporin bán tổng hợp từ penicillin G.**

**1.6.4. Sản xuất các chế phẩm beta - lactam bán tổng hợp có hoạt tính kìm hãm beta- lactamase**

## **CHƯƠNG 2: CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT MỘT SỐ CHẤT KHÁNG SINH KHÁC**

### **PHẦN 3: CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT VACCIN CHO NGƯỜI**

3.1. Cơ sở sinh hóa của công nghệ sản xuất vacxin

3.1.1. Hệ thống miễn dịch của cơ thể

- Hệ thống miễn dịch tự nhiên

- Hệ thống miễn dịch thu được

- Các cơ quan và tế bào tham gia phản ứng miễn dịch

3.1.2. Tính đặc hiệu và ghi nhớ miễn dịch

3.2. Vacxin

3.2.1. Vài nét về lịch sử và hướng phát triển của công nghệ vacxin

3.2.2. Nguyên lý sử dụng vacxin

43.2.3. Đặc tính cơ bản của một vac xin: tính miễn dịch, tính kháng nguyên, hiệu lực, tính không độc

4.2.4. Các vac xin: vacxin bất hoạt, vaxin dưới tổ hợp, vacxin tái tổ hợp, giải độc tố

#### 4.3. Công nghệ sản xuất vac xin

4.3.1. Cơ sở cho việc thiết kế các loại vaxin: thông tin về mầm bệnh, con đường lây nhiễm, dịch tễ học.

4.3.2. Một số kỹ thuật thông dụng được sử dụng trong sản xuất vac xin: Kỹ thuật nuôi tế bào, kỹ thuật gây nhiễm virus, kỹ thuật lên men, kỹ thuật ADN tái tổ hợp, kỹ thuật tách tinh chế protein.

4.3.3. Kiểm tra chất lượng của vacxin.

#### 4.4. Minh họa một vài qui trình sản xuất vacxin

4.4.1. Vacxin sống giảm độc lực (Vacxin bại liệt uống trên tế bào thận khi)

4.4.2. Vacxin dưới đơn vị (Vacxin viêm gan chế từ huyết thanh người)

4.4.3. Vacxin bất hoạt tinh chế (Vacxin viêm não Nhật Bản)

4.4.4. Vacxin tam liên (Vacxin DPT: Bạch hầu, ho gà, uốn ván)

4.4.5. Vacxin tái tổ hợp (Vacxin viêm gan B tái tổ hợp)

### ***PHẦN 4: CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT VITAMIN***

3.1. CNSX Ergosterol ( vitamin D2).

3.2. CNSX vitamin B12 ( riboflavin).

3.3. CNSX vitamin B12.( Cyanocobanamin

3.4. CNSX beta- caroten và vitamin C.

# CHƯƠNG 1

## ĐẠI CƯƠNG VỀ CHẤT KHÁNG SINH

### 1.1. ĐẠI CƯƠNG VỀ CHẤT KHÁNG SINH:

Sự phát triển về vi sinh vật học nói chung, và vi sinh vật công nghiệp nói riêng, với bước ngoặt lịch sử là phát minh vĩ đại về chất kháng sinh của Alexander Fleming (1928) đã mở ra kỷ nguyên mới trong y học: khai sinh ra ngành công nghệ sản xuất chất kháng sinh và ứng dụng thuốc kháng sinh vào điều trị cho con người.

Thuật ngữ " *chất kháng sinh*" lần đầu tiên được Pasteur và Joubert (1877) sử dụng để mô tả hiện tượng kìm hãm khả năng gây bệnh của vi khuẩn *Bacillus anthracis* trên động vật nhiễm bệnh nếu tiêm vào các động vật này một số loại vi khuẩn hiếu khí lành tính khác. Babes (1885) đã nêu ra định nghĩa hoạt tính kháng khuẩn của một chủng là đặc tính tổng hợp được các hợp chất hoá học có hoạt tính kìm hãm các chủng đối kháng.

Nicolle (1907) là người đầu tiên phát hiện ra hoạt tính kháng khuẩn của *Bacillus subtilis* có liên quan đến quá trình hình thành bào tử của loại trực khuẩn này. Gratia và đồng nghiệp (1925) đã tách được từ nấm mốc một chế phẩm có thể sử dụng để điều trị hiệu quả các bệnh truyền nhiễm trên da do cầu khuẩn.

Mặc dù vậy, trong thực tế mãi tới năm 1929 thuật ngữ " *Chất kháng sinh*" mới được Alexander Fleming mô tả một cách đầy đủ và chính thức trong báo cáo chi tiết về penicillin.

Thập kỷ 40 và 50 của thế kỷ XX đã ghi nhận những bước tiến vượt bậc của ngành công nghệ sản xuất kháng sinh non trẻ, với hàng loạt sự kiện như :

- ♦ Khám phá ra hàng loạt Chất kháng sinh, thí dụ như Griseofulvin (1939), gramicidin S (1942) , Streptomycin (1943), bacitracin (1945), cloramphenicol và polymycin (1947), clotetracyclin và Cephalosporin (1948), neomycin (1949), oxytetracyclin và nystatin (1950), erythromycin (1952), cycloserin (1954), amphotericin B và Vancomycin (1956), metronidazol, kanamycin và rifamycin (1957)...

- ♦ Áp dụng phối hợp các kỹ thuật tuyển chọn và tạo giống tiên tiến (đặc biệt là các kỹ thuật gây đột biến, kỹ thuật dung hợp tế bào, kỹ thuật tái tổ hợp gen ...) đã tạo ra những biến chủng công nghiệp có năng lực "siêu tổng hợp" các chất kháng sinh cao gấp hàng ngàn lần các chủng ban đầu.

♦ Triển khai thành công công nghệ lên men chìm quy mô sản xuất công nghiệp để sản xuất *Penicillin G* (1942) và việc hoàn thiện công nghệ lên men này trên các sản phẩm khác.

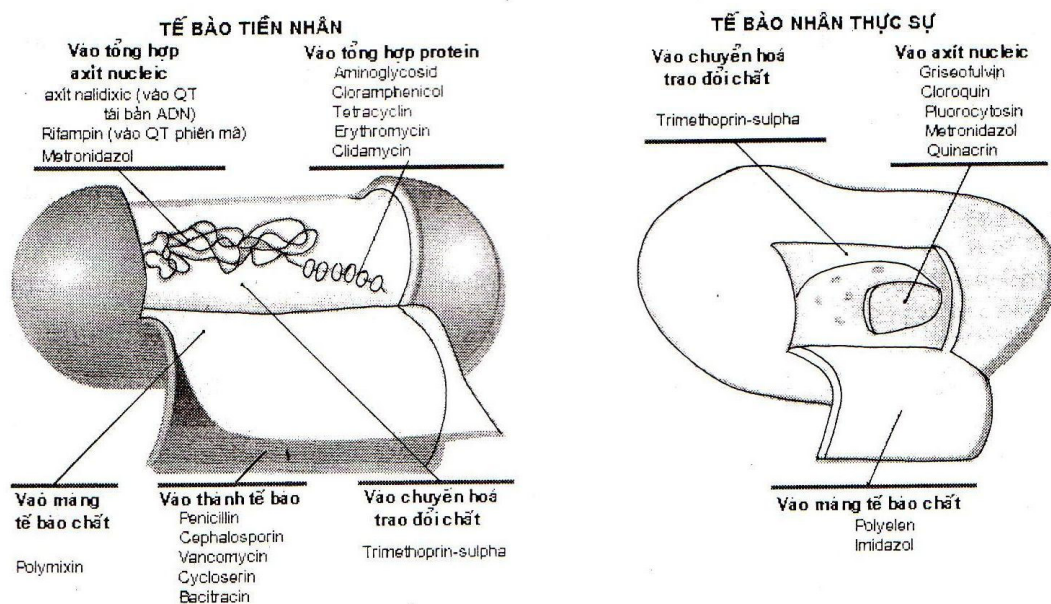
♦ Việc phát hiện, tinh chế và sử dụng axit 6 - aminopenicillanic (6-APA, 1959) làm nguyên liệu để sản xuất các chất kháng sinh penicilin bán tổng hợp đã cho phép tạo ra hàng loạt dẫn xuất penicilin và một số kháng sinh  $\beta$  - lactam bán tổng hợp khác.

### 1.1.1. Định nghĩa kháng sinh:

Chất kháng sinh được hiểu là các chất hoá học xác định, không có bản chất enzym, có nguồn gốc sinh học (trong đó phổ biến nhất là từ vi sinh vật), với đặc tính là ngay ở nồng độ thấp (hoặc rất thấp) đã có khả năng ức chế mạnh mẽ hoặc tiêu diệt được các vi sinh vật gây bệnh mà vẫn đảm bảo an toàn cho người hay động vật được điều trị.

### 1.1.2. Cơ chế tác dụng:

Cơ chế tác dụng lên vi sinh vật gây bệnh ( hay các đối tượng gây bệnh khác - gọi tắt là mầm bệnh) của mỗi chất kháng sinh thường mang đặc điểm riêng, tùy thuộc vào bản chất của kháng sinh đó; trong đó, những kiểu tác động thường gặp là làm rối loạn cấu trúc thành tế bào, rối loạn chức năng điều tiết quá trình vận chuyển vật chất của màng tế bào chất, làm rối loạn hay kiềm toả quá trình sinh tổng hợp protein, rối loạn quá trình tái bản ADN, hoặc tương tác đặc hiệu với những giai đoạn nhất định trong các chuyển hóa trao đổi chất (hình 1.1)



**Hình 1.1. Vị trí tác dụng chính của một số chất kháng sinh**

### 1.1.3. Đơn vị kháng sinh:

Năng lực tích tụ kháng sinh của chủng hay nồng độ chất kháng sinh thường được biểu thị bằng một trong các đơn vị là : mg/ml,  $\mu$ g/ml, hay đơn vị kháng sinh UI/ml (hay UI/g, *International Unit* .

Đơn vị của mỗi kháng sinh được định nghĩa là lượng kháng sinh tối thiểu pha trong một thể tích quy ước dung dịch có khả năng ức chế hoàn toàn sự phát triển của chủng vi sinh vật kiểm định đã chọn, thí dụ, với penicillin là số miligam penicillin pha vào trong 50 ml môi trường canh thang và sử dụng *Staphylococcus aureus 209P* làm chủng kiểm định; với Streptomycin là số miligam pha trong 1 ml môi trường canh thang và kiểm định bằng vi khuẩn *Escherichia coli*).

### 1.1.4. Hoạt tính kháng sinh đặc hiệu:

Hoạt tính kháng sinh đặc hiệu là đặc tính cho thấy năng lực kìm hãm hay tiêu diệt một cách chọn lọc các chủng vi sinh gây bệnh, trong khi không gây ra các hiệu ứng phụ quá ngưỡng cho phép trên người bệnh được điều trị. Đặc tính này được biểu thị qua hai giá trị là:

**Nồng độ kìm hãm tối thiểu** (*Minimum Inhibitory Concentration* - Viết tắt là **MIC**) và **nồng độ diệt khuẩn tối thiểu** (*Minimum Bactericidal Concentration* - Viết tắt là **MBC**), xác định trên các đối tượng vi sinh vật gây bệnh kiểm định lựa chọn tương ứng cho mỗi chất kháng sinh.

### 1.1.5. Phổ kháng khuẩn của kháng sinh:

Phổ kháng khuẩn của chất kháng sinh biểu thị số lượng các chủng gây bệnh bị tiêu diệt bởi kháng sinh này. Theo đó, chất kháng sinh có thể tiêu diệt được nhiều loại mầm bệnh khác nhau được gọi là chất kháng sinh phổ rộng, chất kháng sinh chỉ tiêu diệt được ít mầm bệnh là chất kháng sinh phổ hẹp.

## 1.2. Hiện tượng kháng thuốc và bản chất kháng thuốc của vi sinh vật:

**Hiện tượng kháng thuốc:** Hiện tượng mầm bệnh vẫn còn sống sót sau khi đã điều trị kháng sinh được gọi là hiện tượng kháng thuốc (trên phương diện kiểm nghiệm, vi sinh vật gây bệnh được coi là kháng thuốc nếu nồng độ MIC của chất kháng sinh kiểm nghiệm in vitro trên đối tượng này cao hơn nồng độ điều trị tối đa cho phép đối với bệnh nhân. Có hai dạng kháng thuốc:

**Khả năng đề kháng sinh học:** Khả năng kháng thuốc của vi sinh vật gây bệnh có thể được hình thành ngẫu nhiên trong quần thể, nghĩa là khả năng này đã được hình



thành ở mầm bệnh ngay khi chúng chưa tiếp xúc với môi trường chứa chất kháng sinh. Dạng kháng thuốc này được gọi là khả năng đề kháng sinh học. Nguyên nhân của hiện tượng này có thể do đột biến ngẫu nhiên trong nhiễm sắc thể làm trong quần thể vi sinh vật gây bệnh xuất hiện các tế bào (hay thậm chí chỉ cần một vài tế bào) có khả năng kháng thuốc. Do đó, khi bệnh nhân được điều trị kháng sinh trong một thời gian nhất định thì chỉ có các tế bào thường bị tiêu diệt, còn các tế bào kháng thuốc này vẫn còn sống sót, tiếp tục sinh trưởng phát triển dần bù đắp cho cả số tế bào đã bị tiêu diệt. Kết quả làm thay đổi hoàn toàn bản chất vi sinh của bệnh và vô hiệu hóa tác dụng điều trị của thuốc kháng sinh đó.

**Khả năng đề kháng điều trị:** Khả năng kháng thuốc của vi sinh vật gây bệnh thường xuất hiện phổ biến hơn nhiều sau khi chúng đã tiếp xúc với kháng sinh, vì vậy trường hợp này còn được gọi là khả năng đề kháng điều trị. Nguyên nhân của hiện tượng này là do trong tế bào vi sinh vật có chứa các yếu tố kháng thuốc R tiềm ẩn (*Resistance Factor*). Yếu tố kháng thuốc R có bản chất plasmid. Khi vi sinh vật sống trong môi trường có kháng sinh, các plasmid kháng thuốc của chúng sẽ được hoạt hoá, tự sao chép tổng hợp ra vô số plasmid mới. Chính hoạt tính của các plasmid này sẽ làm tăng sức đề kháng cho tế bào chủ, nhờ vậy chúng vẫn có thể tồn tại và phát triển trong môi trường có kháng sinh. Do có bản chất plasmid nên các yếu tố kháng thuốc R này rất dễ dàng vận chuyển qua lại giữa các loài gần gũi nhau qua biến nạp, tải nạp hay tiếp hợp.

#### **Nguyên nhân hiện tượng kháng thuốc:**

- Việc sử dụng cùng loại kháng sinh kéo dài hoặc lạm dụng thuốc kháng sinh (tùy tiện sử dụng thuốc không đúng liều lượng, không đúng chỉ định và không đủ thời gian cần thiết) đã vô tình tạo ra ưu thế phát triển cạnh tranh cho các chủng vi sinh vật có khả năng kháng thuốc, đồng thời trở thành liệu pháp kích thích các chủng kháng thuốc này tổng hợp ra vô số plasmid mới.

- Xu thế sử dụng tùy tiện chất kháng sinh trong chăn nuôi, đặc biệt là bổ sung vào khi chế biến thức ăn gia súc, gia cầm nuôi lấy thịt, trứng, sữa ... Khi đó, ngoài các tác dụng có lợi dự kiến, chính chất kháng sinh bổ sung sẽ tạo ra môi trường phát triển chọn lọc cho các chủng mang yếu tố kháng thuốc R trên động vật nuôi. Khi sử dụng thịt, trứng, sữa ... của chúng làm nguyên liệu chế biến, các chủng kháng thuốc này sẽ kéo theo vào trong các sản phẩm thực phẩm. Kết quả khi người tiêu dùng sử dụng các thực phẩm này, một mặt họ phải tiếp nhận phần dư lượng kháng sinh trong sản phẩm; nhưng mặt khác, nguy hiểm hơn là các loại vi sinh vật kháng thuốc trong các sản phẩm thực phẩm thuộc nhóm này có ưu thế tồn tại, phát triển cao hơn và các plasmid kháng thuốc của chúng lại đang ở trong trạng thái hoạt hoá.

**Cơ chế của sự kháng thuốc:** Cơ chế của sự kháng thuốc rất đa dạng và thường khác nhau đối với từng chủng vi sinh vật:

\* Một số loài vi sinh vật có khả năng kháng thuốc tự nhiên với một số kháng sinh nhất định, do thuốc này không tác động lên chúng (thí dụ như: nấm, virus, nguyên sinh động vật, do trên thành tế bào không có lớp peptidoglycan nên không chịu tác động của các kháng sinh  $\beta$  – lactam).

\* Một số chủng vốn nhạy cảm với chất kháng sinh trở nên kháng thuốc khi chúng thu nhận được một trong các đặc tính mới như:

Có khả năng vô hoạt hay phá hủy chất kháng sinh (bằng cách tổng hợp ra các enzym ngoại bào làm phá vỡ cấu trúc của chất kháng sinh hay liên kết với chất kháng sinh để tạo ra dạng kém hiệu lực kháng sinh hơn).

Có thể tự điều chỉnh khả năng hấp thụ của màng tế bào chất làm giảm hoặc ngăn ngừa chất kháng sinh xâm nhập vào tế bào chất.

Có khả năng làm biến đổi cấu trúc phân tử của nơi hoặc vị trí mà chất kháng sinh tác dụng vào

Tự điều chỉnh thay đổi đường hướng trao đổi chất để vô hiệu hóa tác dụng của chất kháng sinh đó...

**Hiện tượng kháng chéo:** Bên cạnh hai hiện tượng kháng thuốc nêu trên, trong thực tiễn còn tồn tại hiện tượng kháng chéo (hay kháng nhóm), nghĩa là một chủng khi đã kháng lại chất kháng sinh nhất định thì chúng cũng có khả năng kháng luôn một số chất kháng sinh khác cùng nhóm cấu trúc hay có các đặc tính tương đồng với chất kháng sinh ấy, thí dụ như một số chủng vi sinh vật gây bệnh đã kháng được penicillin thì cũng có trường hợp kháng luôn nhiều kháng sinh  $\beta$  - lactam khác.

**Khắc phục hiện tượng kháng thuốc của vi sinh vật gây bệnh:** giải pháp trực quan và đơn giản là sử dụng các dạng kháng sinh mới. Tuy nhiên, việc tìm kiếm, phát hiện và sản xuất một kháng sinh mới là cả một khối lượng công việc khổng lồ, tiêu tốn rất nhiều thời gian, nhân lực và tiền bạc

Trước hết cần triệt để tôn trọng ba nguyên tắc sử dụng thuốc kháng sinh là:

♦ Chỉ định điều trị kháng sinh đúng (làm kháng sinh đồ để chọn đúng kháng sinh thích hợp để chỉ định điều trị; dùng thuốc đúng liều, đúng phác đồ, đủ thời gian điều trị; chú ý phát hiện sớm dấu hiệu kháng thuốc);

♦ Không lạm dụng kháng sinh khi chưa cần thiết (không lạm dụng "điều trị phòng ngừa" bằng thuốc kháng sinh, nghiêm cấm bệnh nhân tự chỉ định điều trị thuốc kháng sinh thay bác sĩ);

♦ Nghiêm cấm sử dụng tràn lan chất kháng sinh trong chăn nuôi và giám sát chặt chẽ việc sử dụng kháng sinh trong thú y.

### **1.3. ĐIỀU CHỈNH SINH TỔNG HỢP CHẤT KHÁNG SINH:**

Cũng như với tất cả quá trình lên men khác, việc điều chỉnh sinh tổng hợp chất kháng sinh trên nguyên tắc có thể được thực hiện qua hàng loạt cơ chế khác nhau, thí dụ, cơ chế cảm ứng, cơ chế kiểm soát, cơ chế ức chế ngược ... Trong thực tiễn cần phải phối hợp hàng loạt các giải pháp khoa học và công nghệ, cụ thể có thể phân chia thành hai nhóm lớn là:

- ♦ Tuyển chọn và tạo ra các chủng công nghiệp siêu tổng hợp chất kháng sinh ;
- ♦ Tối ưu hoá thành phần môi trường, thiết bị lên men và điều kiện vận hành quá trình lên men.

#### **1.3.1. Tuyển chọn và tạo ra các chủng công nghiệp siêu tổng hợp chất kháng sinh :**

Đây là thành quả của sự phối hợp đồng bộ hàng loạt giải pháp kỹ thuật tuyển chọn giống và tạo chủng tiên tiến như: kỹ thuật gây đột biến, kỹ thuật dung hợp tế bào, kỹ thuật tái tổ hợp và các giải pháp kỹ thuật gen khác

Nhìn chung, quá trình tuyển chọn tạo chủng công nghiệp siêu tổng hợp kháng sinh cũng thường trải qua sáu giai đoạn cơ bản là:

- Phân lập từ thiên nhiên.
- Nghiên cứu xử lý tạo các biến chủng " Siêu tổng hợp" có hoạt lực cao.
- Tuyển chọn sơ bộ.
- Tuyển chọn lại thu các chủng có hoạt tính cao quy mô phòng thí nghiệm.
- Thử nghiệm và tuyển chọn lại trên quy mô sản xuất thử nghiệm pilot.
- Thử nghiệm và chọn lọc lại các chủng phù hợp với điều kiện lên men sản xuất lớn công nghiệp.

Trong các giai đoạn trên, bước tuyển chọn lại quy mô phòng thí nghiệm là công đoạn tuyển chọn toàn diện và kỹ lưỡng nhất;

Mục tiêu của quá trình tuyển chọn tạo biến chủng công nghiệp không chỉ dừng lại ở năng lực siêu tổng hợp kháng sinh của chủng, mà còn định hướng đồng thời vào các mục tiêu khác như: tạo ra các biến chủng tích tụ ít các sản phẩm không mong muốn, các biến chủng tổng hợp ra các sản phẩm hoàn toàn mới (nhất là các sản phẩm

có cấu trúc và đặc tính mong muốn theo "thiết kế" của con người), các biến chủng rất nhạy cảm với chất kháng sinh hay các chủng có sức đề kháng cao với những chất kháng sinh nào đó .... Việc tuyển chọn và tạo chủng công nghiệp là công việc lâu dài và tiêu tốn rất nhiều nhân lực, đòi hỏi phải được tiến hành nghiêm túc, liên tục và thường xuyên.

### **1.3.2. Tối ưu hoá thành phần môi trường, thiết bị lên men và điều kiện vận hành quá trình lên men:**

- Việc tối ưu hóa thành phần môi trường lên men có vai trò rất quan trọng, quyết định năng lực và hiệu quả chung của toàn quá trình: xác định nguồn nguyên liệu chính, thành phần môi trường lên men, nồng độ tương ứng của từng cấu tử trong từng thời điểm cụ thể, đều được xác định qua con đường thực nghiệm, trên cơ sở kiểm tra trên hàng loạt cơ chất dự kiến chính, các tiền chất, các chất dinh dưỡng khác, các chất phụ gia kỹ thuật...

. Nguồn thức ăn cacbon thường được lựa chọn là: các loại bột và hạt ngũ cốc, cám mỳ, cám gạo, vỏ khoai tây, ri đường, các loại đường ( glucoza, fructoza, maltoza, lactoza ...) dextrin, glycerin, axit axetic, manit, các loại rượu, dịch thủy phân gỗ, nước thải hồ sunfit...

. Nguồn thức ăn nitơ có thể là: bột đậu tương, nước chiết ngô, cao nấm men, nước chiết nấm nem, pepton, các muối  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ...

Các nguyên tố khoáng đa lượng thường gặp như: photpho, lưu huỳnh, ma nhê, sắt, canxi, kali, natri; các nguyên tố vi lượng như: đồng, kẽm, coban, molipden... và các chất sinh trưởng..

.Việc thay đổi thành phần môi trường, nồng độ các cấu tử và sự biến thiên nồng độ của chúng trong suốt quá trình có quan hệ chặt chẽ với hoạt động trao đổi chất của vi sinh vật, vì vậy quan hệ chặt chẽ đến các sản phẩm tạo thành của quá trình.

- Ngoài ra, trong quá trình lên men, người ta còn khai thác hiệu quả tác động của các yếu tố khác trong môi trường như: nhiệt độ lên men tối ưu, pH, nồng độ oxy, thế oxy hóa khử, cường độ sục khí, cường độ khuấy trộn dịch lên men ..

Như vậy hiệu quả sinh tổng hợp sản phẩm thu được bao giờ cũng là kết quả của sự phối hợp tác dụng của tất cả các yếu tố, các điều kiện trang thiết bị công nghệ cấu thành nên công nghệ lên men các sản phẩm đó.

## CHƯƠNG 2

### CÔNG NGHỆ LÊN MEN KHÁNG SINH PENICILLIN

#### 2.1. ĐIỂM LỊCH SỬ PHÁT HIỆN VÀ SẢN XUẤT PENICILLIN

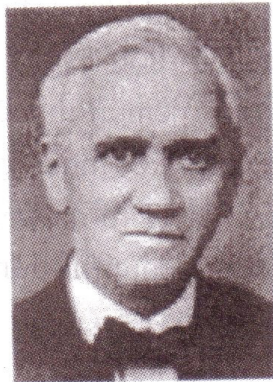
- Phát hiện tình cờ vào năm 1928 do Alexander Fleming, khi nhận thấy một hộp petri nuôi *Staphylococcus* bị nhiễm nấm mốc *Penicillium notatum* có xuất hiện hiện tượng vòng vi khuẩn bị tan xung quanh khuẩn lạc nấm.

Ông đã sử dụng ngay tên giống nấm *Penicillin* để đặt tên cho chất kháng sinh này (1929).

Mỹ đã triển khai lên men thành công *penicillin* theo phương pháp lên men bề mặt (1931). Tuy nhiên, cũng trong khoảng thời gian đó mọi nỗ lực nhằm tách và tinh chế penicillin từ dịch lên men đều thất bại do không bảo vệ được hoạt tính kháng sinh của chế phẩm tinh chế và do đó vấn đề penicillin tạm thời bị lãng quên.

Năm 1938 ở Oxford, khi tìm lại các tài liệu khoa học đã công bố, Ernst Boris Chain quan tâm đến phát minh của Fleming và ông đã đề nghị Howard Walter Florey cho tiếp tục triển khai nghiên cứu này. Ngày 25/05/1940 penicillin đã được thử nghiệm rất thành công trên chuột.

1942: đã tuyển chọn được chủng công nghiệp *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 (1943) và sau đó đã được biến chủng *P. chrysogenum* Wis Q - 176 (chủng này được xem là chủng gốc của hầu hết các chủng công nghiệp đang sử dụng hiện nay trên toàn thế giới); đã thành công trong việc điều chỉnh đường hướng quá trình lên men để lên men sản xuất penicillin G (bằng sử dụng tiền chất Phenylacetic, 1944)....



Sir Alexander Fleming  
1881 - 1955, Vương quốc Anh



Ernst Boris Chain  
1906 - 1979, Vương quốc Anh

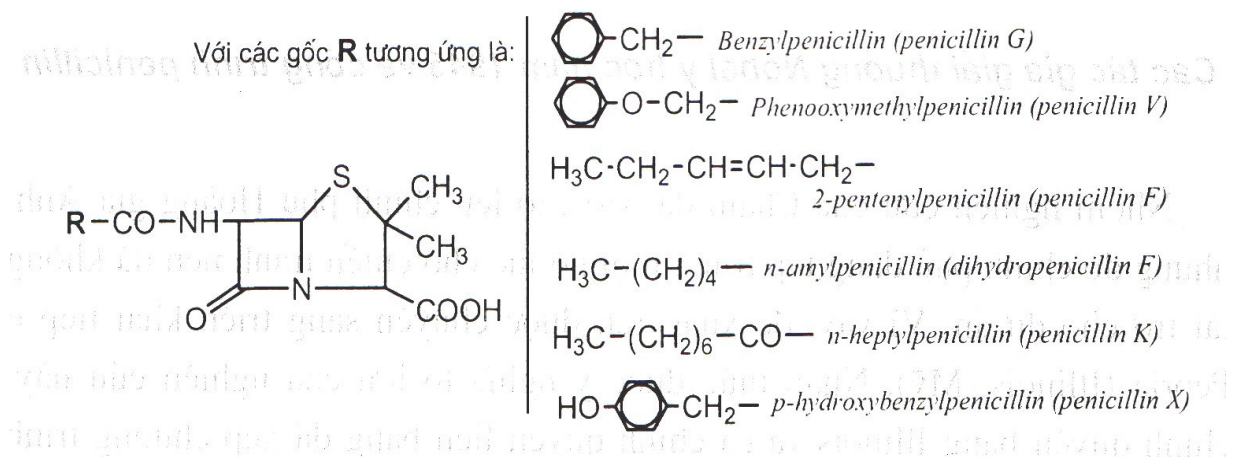


Sir Howard Walter Florey  
1898 - 1968, Úc

### Hình 2.1. Các tác giả giải thưởng Nobel y học năm 1945 về công trình penicillin

Penicillin được xem là loại kháng sinh phổ rộng, được ứng dụng rộng rãi trong điều trị và được sản xuất ra với lượng lớn nhất trong số các chất kháng sinh đã được biết hiện nay. Chúng tác dụng lên hầu hết các vi khuẩn Gram dương và thường được chỉ định điều trị trong các trường hợp viêm nhiễm do liên cầu khuẩn, tụ cầu khuẩn, thí dụ như viêm màng não, viêm tai - mũi - họng, viêm phế quản, viêm phổi, lậu cầu, nhiễm trùng máu... Thời gian đầu penicillin được ứng dụng điều trị rất hiệu quả. Tuy nhiên, chỉ vài năm sau đã xuất hiện các trường hợp kháng thuốc và hiện tượng này ngày càng phổ biến hơn.

Vì vậy 1959, Batchelor và đồng nghiệp đã tách ra được axit 6-aminopenicillanic. Đây là nguyên liệu để sản xuất ra hàng loạt chế phẩm penicillin bán tổng hợp khác nhau. Ngày nay trên thế giới đã sản xuất ra được trên 500 chế phẩm penicillin ( trong đó chỉ lên men trực tiếp hai sản phẩm là penicillin V và penicillin G) và tiếp tục triển khai để sản xuất các chế phẩm penicillin bán tổng hợp khác.



Hình 2.2: Sản phẩm penicillin lên men tự nhiên nhờ *P.chrysogenum*

## 2.2. CƠ SỞ CÔNG NGHỆ SINH TỔNG HỢP PENICILLIN NHỜ NẤM MỐC:

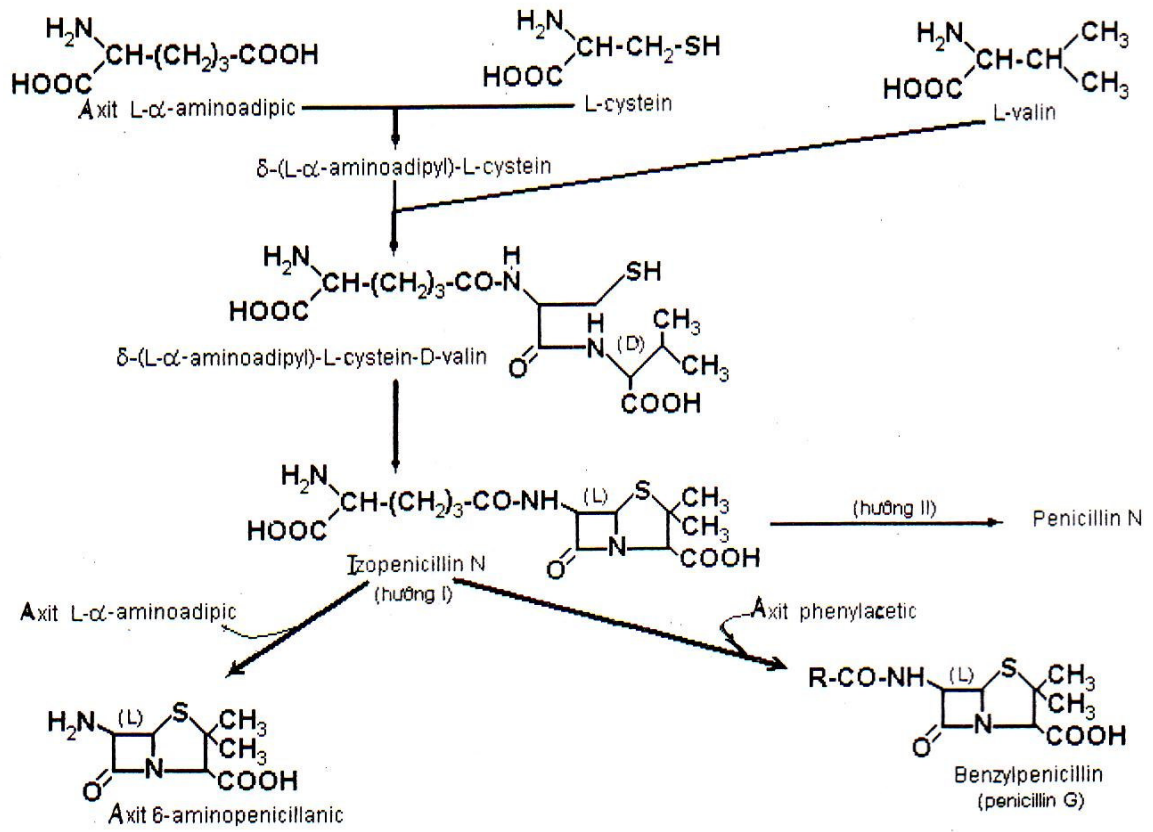
### 2.2.1. Lịch sử tuyển chọn chủng công nghiệp *P. chrysogenum* :

Vào những năm đầu, việc nghiên cứu sản xuất penicillin thường sử dụng các chủng có hoạt lực cao thuộc loài *P. notatum* và *P. baculatum*. Nhưng từ khi trường đại học Wisconsin (Mỹ) phân lập được chủng *P. chrysogenum* có hoạt tính cao hơn thì chủng này dần dần đã thay thế và từ khoảng sau những năm 50 của thế kỷ XX đến nay tất cả các công ty sản xuất penicillin trên thế giới đều sử dụng các biến chủng *P. chrysogenum* công nghiệp.

- Việc tuyển chọn chủng công nghiệp để lên men sản xuất penicillin trên nguyên tắc cũng trải qua sáu giai đoạn cơ bản đã mô tả trong mục 1.3.1, trong đó giải pháp kỹ thuật đã được áp dụng hiệu quả để thu nhận biến chủng "siêu tổng hợp" penicillin lại chính là các kỹ thuật gây đột biến thường như: xử lý tia Rơn - ghen, xử lý tia cực tím và tạo đột biến bằng hoá chất, thí dụ như Metylbis - amin (metyl -2- $\beta$ -clo-etylamin), N-mustar (tris -  $\beta$ -clo-etylamin), Sarcrolyzin, HNO<sub>2</sub>, Dimetylsulfat, 1,2,3,4-diepoxybutan.

### 2.2.2. Cơ chế sinh tổng hợp penicillin ở nấm mốc *P. chrysogenum* :

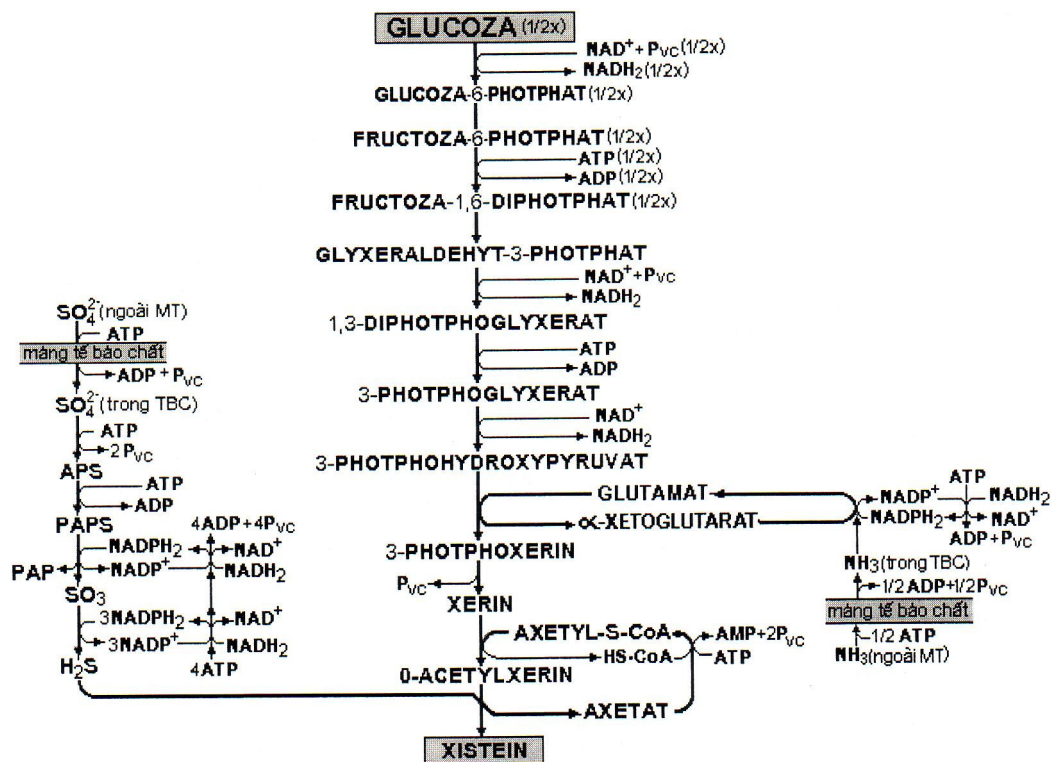
Theo quan điểm phổ biến hiện nay, quá trình sinh tổng hợp penicillin ở nấm mốc *P. chrysogenum* có thể tóm tắt như sau: từ ba tiền chất ban đầu là  $\alpha$ -aminoadipic, cystein và valin sẽ ngưng tụ lại thành tripeptit  $\delta$ -( $\alpha$ -aminoadipyl) - cysteinyl - valin ; tiếp theo là quá trình khép mạch tạo vòng  $\beta$ -lactam và vòng thiazolidin để tạo thành izopenicillin-N; rồi trao đổi nhóm  $\alpha$ -aminoadipyl với phenylacetic (hay phenoxyacetic) tạo thành sản phẩm penicillin G (hay penicillin V, xem sơ đồ tổng hợp penicillin G trong hình 2.3.



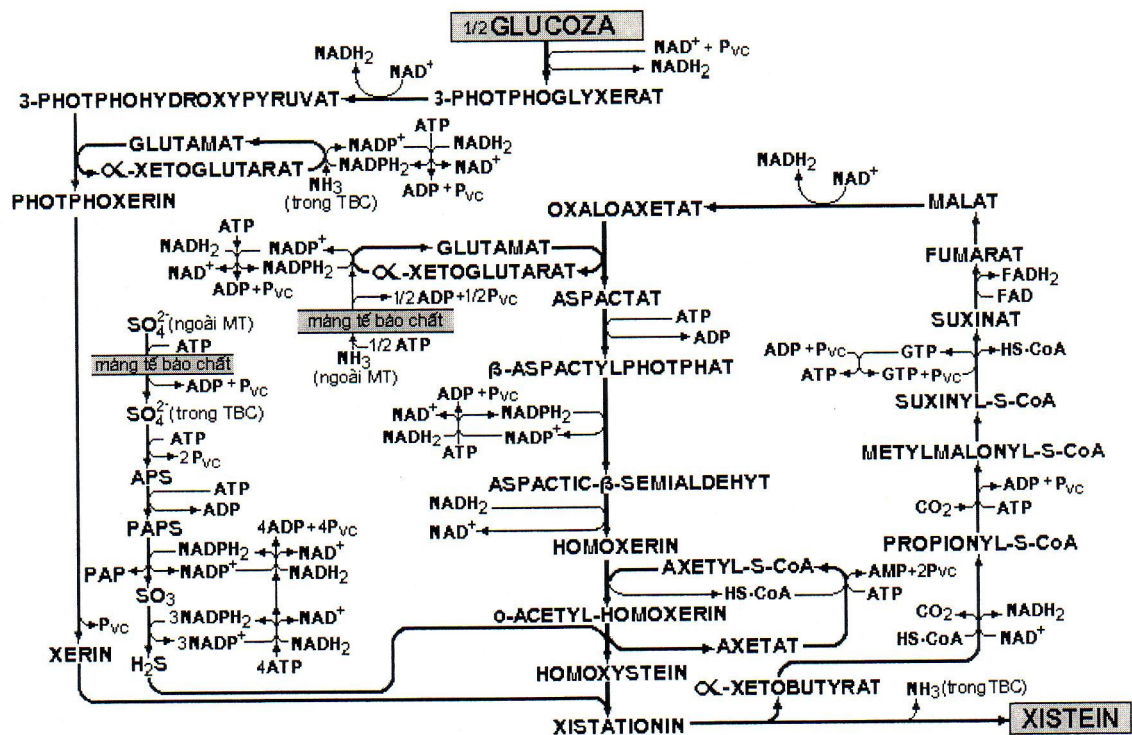
**Hình 2.3. Sơ đồ cơ chế sinh tổng hợp penicillin từ axit L-α aminoadipic, L-cystein và L-valin**

Trong 3 axit amin tiền chất trên thì cystein có thể được tổng hợp bằng một trong ba con đường là được tổng hợp từ xerin (hình 2.4), từ homoxerin với việc tuần hoàn chuyển hóa α-cetobutytrat qua oxaloacetat (hình 2.5), hay từ homoxerin với sự chuyển hóa α- cetobutytrat qua izolecin. Đồng thời α- aminoadipic được giải phóng ra trong sơ đồ hình 2.6 có thể được tuần hoàn để tham gia quá trình ngưng tụ ban đầu. .





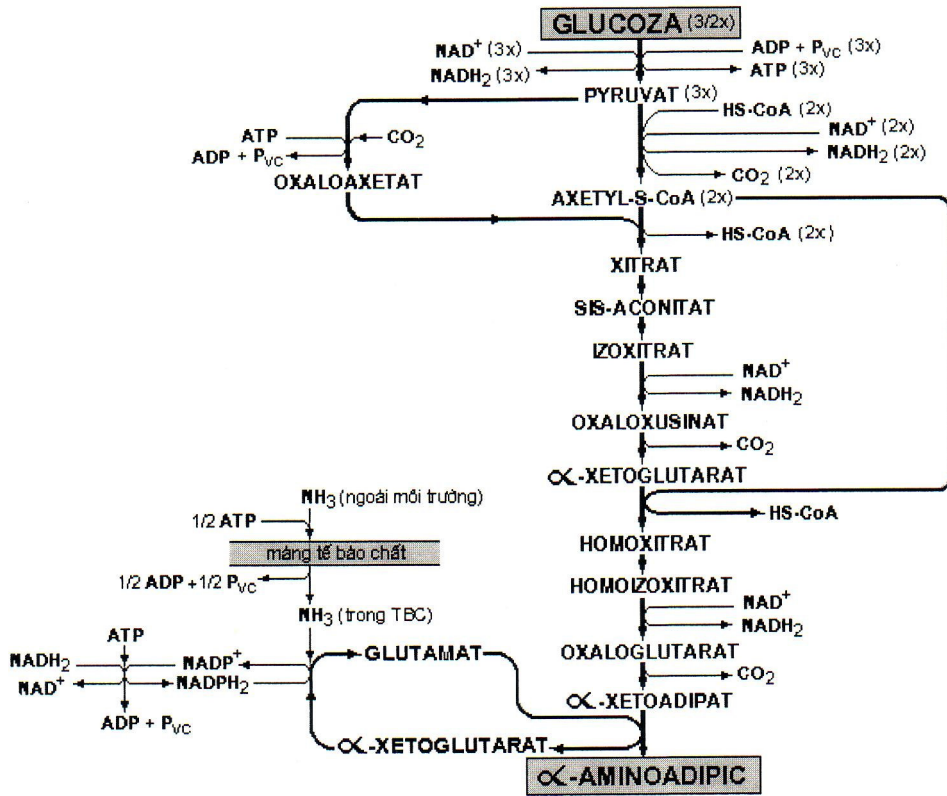
Hình 2.4. Sơ đồ cơ chế sinh tổng hợp cystein từ xerin



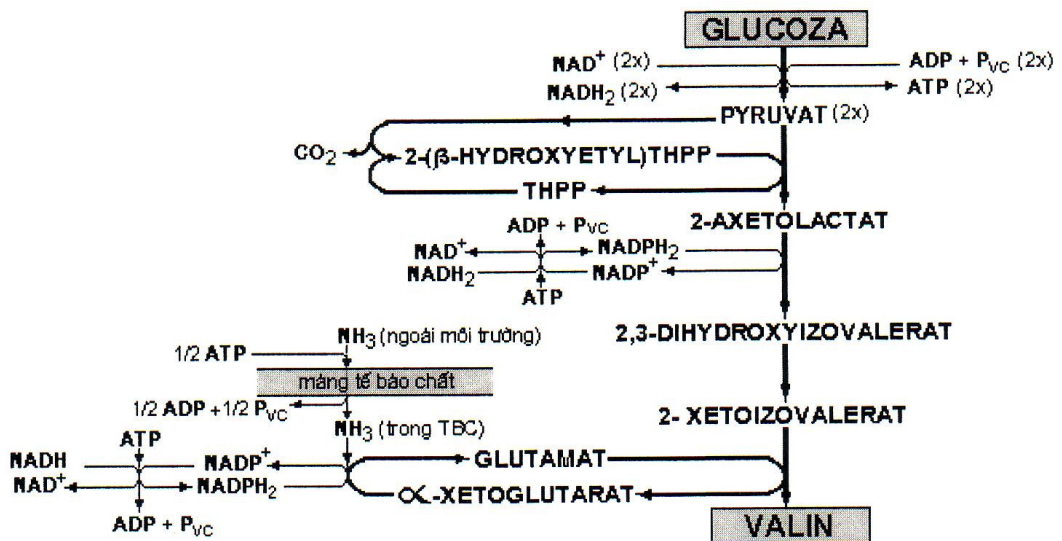
Hình 2.5. Sơ đồ cơ chế sinh tổng hợp cistein từ homoxerin với sự biến đổi  $\alpha$ -cetobutyrat thành oxaloacetat

Tuy nhiên, cũng có thể nó được giải phóng ra và tích tụ trong môi trường (vì trong quá trình lên men sản xuất penicillin V bao giờ cũng phát hiện thấy trong dịch lên men lượng lớn  $\alpha$ -amino adipic dạng vòng). Như vậy, quá trình sinh tổng hợp penicillin, phụ

thuộc vào điều kiện lên men cụ thể nhất định, có thể xảy ra theo sáu đường hướng khác nhau. Do đó, hiệu suất chuyển hoá cơ chất - sản phẩm cũng biến đổi và phụ thuộc vào đường hướng sinh tổng hợp tương ứng. Theo lý thuyết thì hiệu suất lên men sẽ trong khoảng 683 - 1544 UI penicillin/g glucoza; song, trong thực tế, với những chủng có hoạt tính sinh tổng hợp cao nhất cũng mới chỉ đạt khoảng 200 UI/g glucoza.



Hình 2.6. Sơ đồ cơ chế sinh tổng hợp  $\alpha$ -aminoadipic



Hình 2.7. Sơ đồ cơ chế sinh tổng hợp valin

### 2.2.3. Tác động của các thông số công nghệ đến quá trình sinh tổng hợp penicillin.

#### 2.2.3.1. Sự phát triển hệ sợi và đặc điểm hình thái hệ sợi nấm:

**Sự phát triển hệ sợi nấm** trong quá trình lên men bao gồm:

- *Sự tăng trưởng về kích thước hệ sợi* (tăng độ dài sợi, sự lớn lên về kích thước, mức độ phân nhánh của hệ sợi ... )

- *Sự biến thiên về số lượng khóm sợi nấm trong môi trường*: Thông thường, sự phát triển này được đánh giá qua hai chỉ tiêu là: hàm lượng sinh khối và tốc độ biến thiên hàm lượng sinh khối trong môi trường. Hai chỉ tiêu này có thể xác định bằng nhiều phương pháp khác nhau như: hàm lượng sinh khối (Sinh khối tươi hoặc sinh khối khô), mật độ quang dịch lên men, trở lực lọc của dịch lên men, hàm lượng nitơ, hàm lượng hydratcacbon, hàm lượng axit nucleic ... Trong các phương pháp trên, được áp dụng phổ biến hơn cả trong sản xuất công nghiệp là phương pháp xác định qua hàm lượng sinh khối.

Tốc độ phát triển hệ sợi nấm phụ thuộc hàng loạt các yếu tố khác nhau trong quá trình lên men và sự tích tụ penicillin thường xảy ra mạnh mẽ khi hệ sợi phát triển đạt trạng thái cân bằng. Trạng thái này có thể xác lập được khi chỉ cung cấp vừa đủ và liên tục lượng thức ăn tối thiểu cho nấm mốc. Thiếu thức ăn, hệ sợi nấm sẽ tự phân, còn nếu cung cấp quá nhu cầu trên, hệ sợi sẽ phát triển, nhưng không tích tụ mạnh penicillin mà tích tụ nhiều axit gluconic và axit malic.

**Đặc điểm hình thái và cấu trúc hệ sợi nấm**: Trong quá trình lên men, do nhiều nguyên nhân khác nhau, số lượng khóm sợi nấm bao giờ cũng có xu hướng tăng lên, ngay cả trong quá trình lên men tĩnh. Trong điều kiện lên men có sục khí và khuấy trộn, do tác dụng va đập cơ học với cánh khuấy và các chuyển động dòng xoáy trong môi trường, một mặt sự đứt gãy hệ sợi nấm xảy ra nhiều hơn và hệ sợi nấm bao giờ cũng có xu hướng vón cuộn lại thành cấu trúc búi sợi cuộn xoắn, được gọi là pellet.

♦ *Pellet xốp (fluffy loose pellets)* là dạng pellet có phần bên trong hệ sợi cuộn thành khối chắc và mịn, lớp sợi phía bên ngoài cuộn lỏng lẻo tạo thành cấu trúc xốp hơn.

♦ *Pellet chắc và mịn (compact smooth pellets)* có đặc điểm là phần sợi phía bên trong pellet cuộn tương đối chặt chẽ ra đến gần sát lớp sợi phía ngoài, lớp sợi phía ngoài cũng cuộn đủ chắc thành lớp sợi mịn.

♦ *Pellet rỗng (hollow pellets)* là dạng pellet có phần sợi bên trong bị tự phân tạo thành khoảng rỗng, hệ sợi phía bên ngoài cuộn rất chặt thành lớp sợi mịn và chắc chắn.

- Hiệu quả chung của quá trình lên men có quan hệ hữu cơ với số lượng, kích thước và cấu trúc pellet nấm. Trong thực tiễn sản xuất công nghiệp, người ta thường

điều chỉnh các thông số công nghệ theo hướng ưu tiên tạo ra dạng pellet đủ nhỏ và mịn, hạn chế tạo pellet xộp và ngăn ngừa hình thành các pellet rỗng. Điều kiện công nghệ tương ứng với mục tiêu trên thường áp dụng là : tỉ lệ cây giống 10%, với mật độ dịch giống  $(2-10).10^{11}$  bào tử / $m^3$ ; phối hợp điều chỉnh giữa sục khí và khuấy trộn để đảm bảo cung cấp oxy hòa tan dư so với nhu cầu tương ứng với thời điểm lên men, và để tạo ra pellet mịn và nhỏ (kích thước pellet thích hợp nhất khoảng 0,2 - 0,5mm), trong điều kiện đã cân đối với nhu cầu tiết kiệm mức tiêu tốn năng lượng do khuấy trộn.

#### **2.2.3.2. Đặc tính nhiệt động của dịch lên men:**

Trong các thiết bị lên men dung tích lớn có sục khí và khuấy trộn, thực tế không thể xác lập được sự đồng đều tại khắp các vùng thể tích làm việc của thiết bị. Tại các vùng chảy rối (vùng gần cánh khuấy), tốc độ trao đổi nhiệt, tốc độ chuyển khối xảy ra mạnh mẽ hơn. Còn tại các vùng chảy màng (vùng sát thành thiết bị, vùng gần các ống xoắn trao đổi nhiệt, vùng kém hiệu quả hay vùng chết của thiết bị...) tốc độ chuyển khối hay tốc độ truyền nhiệt cũng giảm đi. Ngoài ra, tại những khu vực nhất định của thiết bị có thể xuất hiện vùng xoáy cục bộ hay các dòng chảy thứ cấp làm thiếu hụt về hàm lượng oxy hòa tan.

Các yếu tố nêu trên đây sẽ tác động trực tiếp đến năng lực sinh tổng hợp của chủng, hiệu quả chuyển hóa tạo sản phẩm và hiệu quả kinh tế chung của toàn quá trình lên men. Thực tế thường chọn chế độ khuấy trộn dư trên mức yêu cầu.

#### **2.2.3.3. Thành phần môi trường lên men:**

Môi trường cơ sở để lên men penicillin, vào thời kỳ đầu trong những năm 40 - 50, là môi trường lactoza - nước chiết ngô, với thành phần chính nêu trong bảng 2.1.

**Nguồn cơ chất chính:** là lactoza có thể được thay thế từng phần hoặc toàn bộ bằng các cơ chất khác như: các loại đường hexoza, đường pentoza, disaccarit, dextrin hay thay thế bằng dầu thực vật. Trong các cơ chất nêu trên, hiệu quả cao hơn cả vẫn là glucoza.

Ngoài ra, khi sử dụng dầu thực vật làm chất phá bọt phải xét đến hiệu ứng nấm mốc sử dụng một phần dầu thực vật làm nguồn cung cấp thức ăn cacbon, để tính toán điều chỉnh nồng độ glucoza trong môi trường lên men (và cả sự cản trở quá trình chuyển khối do ảnh hưởng của dầu phá bọt).

**Nguồn cung cấp thức ăn nitơ:** có thể sử dụng là bột đậu tương, bột hạt bông, các loại dầu cá. Nhu cầu về thức ăn nitơ cũng có thể được đáp ứng bằng cách cung cấp liên tục  $(NH_4)_2SO_4$ , nhưng duy trì ở nồng độ thấp, khoảng 250 - 340g/l (nếu dư thừa hiệu quả sinh tổng hợp penicillin sẽ giảm, nếu thiếu sẽ xảy ra hiện tượng tự phân hệ sợi) .

**Hàm lượng các chất khoáng bổ sung:** được tính toán, phụ thuộc vào lượng dịch chiết ngô sử dụng;

**pH môi trường** được điều chỉnh trước khi thanh trùng, sau đó trong suốt quá trình lên men được giám sát chặt chẽ và điều chỉnh theo yêu cầu công nghệ.

**Nồng độ tiền chất tạo nhánh:** Trong quá trình sinh tổng hợp penicillin, việc kết gắn mạch nhánh của phân tử penicillin không mang tính đặc hiệu chặt chẽ. Nhờ vậy, nếu duy trì nồng độ tiền chất tạo nhánh cần thiết phenylacetat (hoặc phenooxyacetat) sẽ cho phép thu nhận chủ yếu một loại penicillin G trong dịch lên men (hoặc penicillin V). Theo lý thuyết, nhu cầu về phenylaceta là 0,47g/gam penicillin G (hoặc phenooxyacetat là 0,50g/gam penicillin V). Cần chú ý cả hai cấu tử trên thực chất đều gây độc cho nấm nên người ta thường lựa chọn giải pháp bổ sung liên tục cấu tử này và khống chế chặt chẽ nồng độ theo yêu cầu, để không làm suy giảm năng lực lên men của chủng sản xuất.

**Bảng 2.1. Thành phần môi trường lên men cơ bản để lên men sản xuất penicillin**

• Lactoza 20-50kg/m <sup>3</sup>	
• Glucoza 0-10kg/ m <sup>3</sup> , bổ sung gián đoạn hoặc liên tục trong quá trình lên men	
• Dịch chiết ngô cô đặc 15-50kg/ m <sup>3</sup>	
• Các khoáng chất	
NaNO <sub>3</sub> 0-5kg/ m <sup>3</sup>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0-1kg/ m <sup>3</sup>
CaCO <sub>3</sub> 0-10kg/ m <sup>3</sup>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0-4kg/ m <sup>3</sup>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0-0,25kg/ m <sup>3</sup>	MgSO <sub>4</sub> 0-0,02kg/ m <sup>3</sup>
ZnSO <sub>4</sub> 0-0,04kg/ m <sup>3</sup>	
• Tiền chất tạo nhánh (phenylacetic hoặc dẫn xuất) bổ sung liên tục theo nhu cầu	
• Chất chống tạo bọt bổ sung liên tục theo nhu cầu	

#### 2.2.3.4. Điều kiện tiến hành lên men:

**Nhiệt độ** là thông số có ảnh hưởng lớn đến sự phát triển của nấm mốc, khả năng sinh tổng hợp và năng lực tích tụ penicillin của chúng. Nhìn chung nấm mốc phát triển thuận lợi hơn ở dải nhiệt độ khoảng 30<sup>0</sup>C. Tuy nhiên, ở dải nhiệt độ này tốc độ phân huỷ penicillin cũng xảy ra mạnh mẽ. Trong thực tế, ở giai đoạn nhân giống sản xuất người ta thường nhân ở dải nhiệt độ 30<sup>0</sup>C; sang giai đoạn lên men thường áp dụng một trong hai chế độ nhiệt là :

♦ Lên men ở một dải nhiệt độ: Thường duy trì nhiệt độ trong suốt quá trình lên men ở dải nhiệt độ 25 - 27<sup>0</sup>C.

♦ Lên men ở hai chế độ nhiệt độ: Giai đoạn lên men bắt đầu tiến hành ở 30<sup>0</sup>C cho đến khi hệ sợi phát triển đạt yêu cầu về hàm lượng sinh khối thì điều chỉnh nhiệt độ sang chế độ lên men penicillin ở dải nhiệt độ 22 - 25<sup>0</sup>C (có công nghệ điều chỉnh xuống 22 - 23<sup>0</sup>C, giữ ở nhiệt độ này tiếp hai ngày rồi chuyển sang lên men tiếp ở 25<sup>0</sup>C cho đến khi kết thúc quá trình lên men).

**pH môi trường** thuận lợi cho sự phát triển hệ sợi và cho quá trình sinh tổng hợp penicillin thường dao động trong khoảng pH = 6,8 - 7,4. Tuy nhiên ở điều kiện pH cao xu hướng phân huỷ penicillin cũng tăng lên. Vì vậy, trong sản xuất pH môi trường thường được khống chế chặt chẽ ở giá trị lựa chọn trong khoảng pH = 6,2 - 6,8.

**Nồng độ oxy hoà tan và cường độ khuấy trộn dịch lên men:** Với nhiều chủng nấm mốc, nồng độ oxy hòa tan thuận lợi cho quá trình sinh tổng hợp penicillin dao động quanh mức 30% nồng độ oxy bão hòa.

**Nồng độ CO<sub>2</sub> trong dịch lên men** ở mức nhất định cũng cần thiết cho quá trình này mầm của bào tử nấm mốc; tuy nhiên nếu nồng độ CO<sub>2</sub> quá cao sẽ làm cản trở quá trình hấp thu và chuyển hoá cơ chất của chủng, nghĩa là làm cản trở quá trình sinh tổng hợp penicillin.

#### **2.2.3.5. Sự tích tụ và phân huỷ penicillin:**

Trong quá trình lên men, do nhiều nguyên nhân khác nhau, trong đó có ảnh hưởng của nồng độ penicillin tích tụ trong môi trường ngày càng tăng, làm cho năng lực sinh tổng hợp penicillin của chủng có xu hướng giảm dần theo thời gian lên men. Đồng thời, phụ thuộc vào nhiệt và pH môi trường, một phần lượng penicillin đã tích tụ cũng bị phân huỷ theo thời gian.

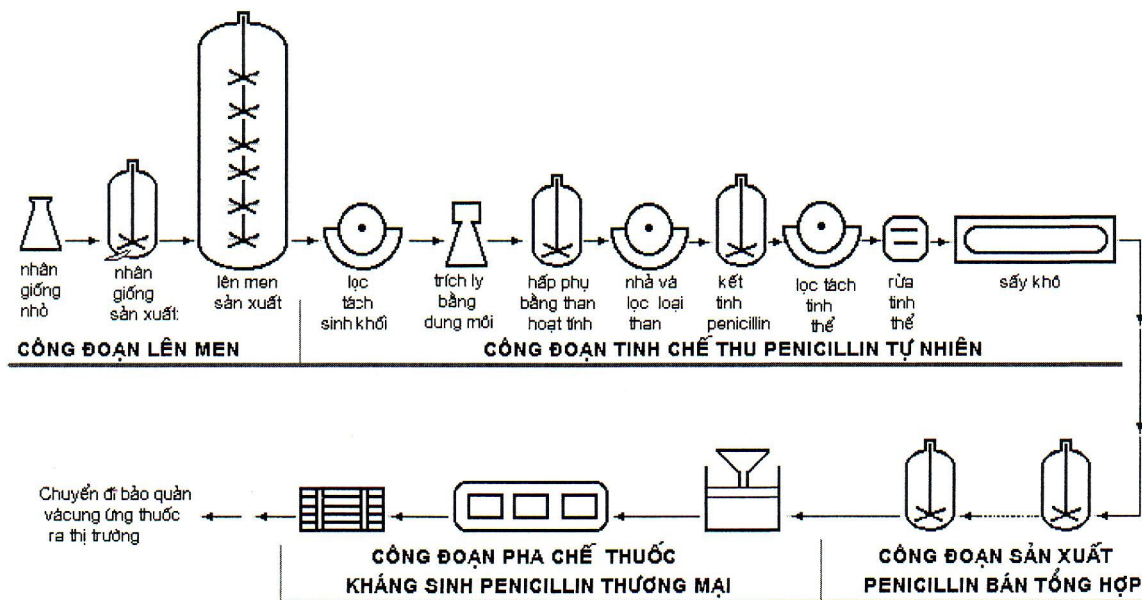
Nhằm giảm tổn thất trên, ngay sau khi kết thúc quá trình lên men cần xử lý thu sản phẩm sớm hoặc có giải pháp hạ thấp nhanh nhiệt độ dịch lên men.

### **2.3. QUY TRÌNH LÊN MEN SẢN XUẤT PENICILLIN TRONG CÔNG NGHIỆP:**

#### **2.3.1. Đặc điểm chung:**

Công nghệ lên men sản xuất penicillin mang nét đặc thù riêng của từng cơ sở sản xuất và các thông tin này rất hạn chế cung cấp công khai, ngay mỗi bằng sáng chế thường cũng chỉ giới hạn ở những công đoạn nhất định; vì vậy rất khó đưa ra được công nghệ tổng quát chung. Theo công nghệ lên men của hãng Gist-Brocades (Hà Lan), toàn bộ dây chuyền sản xuất thuốc kháng sinh penicillin có thể phân chia làm bốn công đoạn chính như sau (xem sơ đồ hình 2.8)

- ♦ Lên men sản xuất penicillin tự nhiên (thường thu penicillin V hoặc penicillin G) .
- ♦ Xử lý dịch lên men tinh chế thu bán thành phẩm penicillin tự nhiên.
- ♦ Sản xuất các penicillin bán tổng hợp (từ nguyên liệu penicillin tự nhiên)
- ♦ Pha chế các loại thuốc kháng sinh penicillin thương mại.



**Hình 2.8. Sơ đồ dây chuyền sản xuất penicillin**

(theo Gist-Brocades Copr. (Hà Lan))

### 2.3.2. Chuẩn bị lên men :

**Giống, bảo quản và nhân giống cho sản xuất:** Giống công nghiệp *P.chrysogenum* được bảo quản lâu dài ở dạng đông khô, bảo quản siêu lạnh ở  $70^{\circ}\text{C}$  hoặc bảo quản trong nitơ lỏng. Giống từ môi trường bảo quản được cấy chuyển ra trên môi trường thạch hộp để hoạt hoá và nuôi thu bào tử. Dịch huyền phù bào tử thu từ hộp petri được cấy chuyển tiếp sang môi trường bình tam giác, rồi sang thiết bị phân giống nhỏ, qua thiết bị nhân giống trung gian ... và cuối cùng là trên thiết bị nhân giống sản xuất. Yêu cầu quan trọng của của công đoạn nhân giống là phải đảm bảo cung cấp đủ lượng giống cần thiết, với hoạt lực cao, chất lượng đảm bảo đúng thời điểm hco các công đoạn nhân giống kế tiếp và cuối cùng là cung cấp đủ lượng giống đạt các yêu cầu kỹ thuật cho lên men sản xuất. Trong thực tiễn, để đảm bảo cho quá trình lên men thuận lợi người ta thường tính toán lượng giống cấy sao cho mật độ giống trong dịch lên men ban đầu khoảng  $1 - 5.10^9$  bào tử /  $\text{m}^3$ .

Thành phần môi trường nhân giống cần được tính toán để đảm bảo cung cấp đủ nguồn thức ăn C, N, các chất khoáng và các thành phần khác, đảm bảo cho sự hình thành và phát triển thuận lợi của pellet.

### Chuẩn bị môi trường lên men và thiết bị:

- Chuẩn bị môi trường lên men:

. Cân đong, pha chế riêng rẽ các thành phần môi trường lên men trong các thùng chứa phù hợp

. Thanh trùng gián đoạn ở 121<sup>0</sup>C ( hay thanh trùng liên tục ở khoảng 140-146<sup>0</sup>C) hoặc lọc qua các vật liệu siêu lọc rồi mới bơm vào thùng lên men.

Nếu đặc tính công nghệ của thiết bị lên men cho phép, có thể pha chế rồi thanh trùng đồng thời dịch lên men trong cùng một thiết bị. Tất cả các cấu tử bổ sung vào môi trường lên men đều phải được xử lý khử khuẩn trước và sau đó bổ sung theo chế độ vận hành vô khuẩn.

- **Thiết bị lên men:** Phải được vô khuẩn trước khi đưa vào sử dụng. Thường thanh trùng bằng hơi quá nhiệt 2,5 – 3,0 at trong thời gian 3 giờ. Đồng thời khử khuẩn nghiêm ngặt tất cả các hệ thống ống dẫn, khớp nối, van, phin lọc và tất cả các thiết bị phụ trợ khác....Trong quá trình lên men luôn cố gắng duy trì áp suất dư trong thiết bị nhằm hạn chế rủi ro do nhiễm tạp.

- **Không khí** thường được khử khuẩn sơ bộ bằng nén đoạn nhiệt, sau đó qua màng lọc vô khuẩn hay màng siêu lọc .

### 2.3.3. Kỹ thuật lên men:

#### 2.3.3.1. Kỹ thuật lên men bề mặt:

Áp dụng từ lâu, hiện nay hầu như không còn được triển khai trong sản xuất lớn nữa. Gồm 2 phương pháp:

\* Lên men trên nguyên liệu rắn (cám mì, cám ngô có bổ sung đường lactoza)

\* Lên men trên bề mặt môi trường lỏng tĩnh (phổ biến sử dụng môi trường cơ bản lactoza- nước chiết ngô)..

Do đường lactoza được nấm mốc đồng hóa chậm nên không xảy ra hiện tượng dư thừa đường trong tế bào. Còn dịch nước chiết ngô cung cấp cho nấm mốc nguồn thức ăn nitơ, các chất khoáng và các chất sinh trưởng, trong đó phenylalanin khi bị thủy phân sẽ tạo thành phenylacetic cung cấp tiền chất tạo mạch nhánh cho phân tử penicillin.

Khi lên men trong môi trường lỏng, áp dụng công nghệ bổ sung liên tục phenylacetic vào môi trường lên men, hàm lượng bổ sung phụ thuộc pH môi trường thường là 0,2-0,8 kg phenylacetic/m<sup>3</sup> dịch lên men. Trong điều kiện đó, lượng penicillin G được tổng hợp tăng rõ rệt còn hàm lượng các penicillin khác cũng giảm đi. Để hạn chế quá trình oxy hóa tiền chất, thường phải bổ sung vào môi trường một lượng nhỏ axit axetic. Trong kỹ thuật lên men lỏng gián đoạn không điều chỉnh pH môi trường thường tăng nhẹ, sau đó tương đối ổn định và vào cuối quá trình lên men thường trong khoảng pH = 6,8-7,4. Khi sử dụng cơ chất chính là lactoza, người ta đã



xác định được penicillin chie được tổng hợp và tích tụ mạnh mẽ trong môi trường khi nấm mốc đã sử dụng đường này và khi lactoza có dấu hiệu cạn kiệt thì sợi nấm cũng bắt đầu tự phân. Vì vậy người ta thường kết thúc quá trình lên men vào thời điểm sắp hết đường lactoza.

### **2.3.3.2. Kỹ thuật lên men chìm:**

*Kỹ thuật lên men chìm* là kỹ thuật được áp dụng trong hầu hết các cơ sở sản xuất penicillin công nghiệp hiện nay và thường được vận hành theo phương pháp lên men bán liên tục, gồm phương án lên men gián đoạn theo mẻ có bổ sung liên tục (hay bán liên tục) một hay một vài cấu tử kết hợp với phương án tuần hoàn lại một phần hệ sợi của mẻ lên men trước (hoặc không). Quá trình lên men được vận hành theo phương pháp lên men hai pha, với pha đầu nuôi thu sinh khối trong khung 2-3 ngày, sau đó chuyển sang pha lên men thu sản phẩm. Trong hầu hết các trường hợp người ta thay thế phần lớn (hoặc hoàn toàn) đường lactoza bằng đường glucoza. Lượng glucoza này có thể được bổ sung liên tục hay bán liên tục nhưng phải giám sát chặt chẽ nồng độ glucoza trong suốt quá trình vận hành pha sau để duy trì nồng độ glucoza luôn ở mức thích hợp nhằm vừa giữ khối lượng hệ sợi ổn định, vừa đảm bảo sinh tổng hợp nhiều penicillin. Trong thực tiễn, để tránh xảy ra thiếu hụt nhất thời glucoza người ta có thể kết hợp bổ sung lượng nhỏ đường lactoza (khi đó, nếu chưa bổ sung kịp glucoza thì nấm mốc sẽ tự điều chỉnh để sử dụng đường lactoza nên không xảy ra hiện tượng tự phân hệ sợi). Ngoài nguồn nitơ trong nước chiết ngô, người ta thường sử dụng phối hợp  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  để vừa cung cấp thức ăn N và S, vừa sử dụng để điều chỉnh pH trong quá trình lên men (pH dịch lên men ban đầu thường được điều chỉnh về khoảng pH=6,5-6,8; bằng dung dịch NaOH hoặc  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ); nồng độ  $\text{NH}_4^+$  thường khống chế trong khoảng 0,3-0,4kg/m<sup>3</sup> dịch lên men. Chất phá bọt thường sử dụng là các loại dầu béo như: mỡ lợn, dầu đậu tương, dầu vừng, dầu cám... Tiền chất tạo nhánh phenylacetic trong lên men sản xuất penicillin G (hoặc

phenoxyacetic trong lên men sản xuất penicillin V) được bổ sung liên tục (hoặc bổ sung gián đoạn làm nhiều lần) trong suốt thời gian pha lên men penicillin, để duy trì nồng độ trong khoảng 0,1-1,0kg/m<sup>3</sup> dịch (nếu ít quá nấm mốc sẽ tổng hợp đồng thời nhiều penicillin khác, nếu nhiều quá sẽ gây độc cho nấm và tăng cường thúc đẩy quá trình hydroxyl hóa sản phẩm penicillin). Nhiệt độ lên men pha đầu khống chế ở 30°C, sau đó sang pha sau giữ ở 22-25°C. Tốc độ sục khí và khuấy trộn được điều chỉnh để duy trì nồng độ oxy hòa tan trong dịch trong khoảng 30%. Trong điều kiện trên thời gian lên men mỗi mẻ thường kéo dài khoảng 144-180 giờ. Kết thúc quá trình lên men người ta cố gắng lọc sớm dịch lên men, làm lạnh rồi chuyển sang công đoạn trích ly và tinh chế thu penicillin.

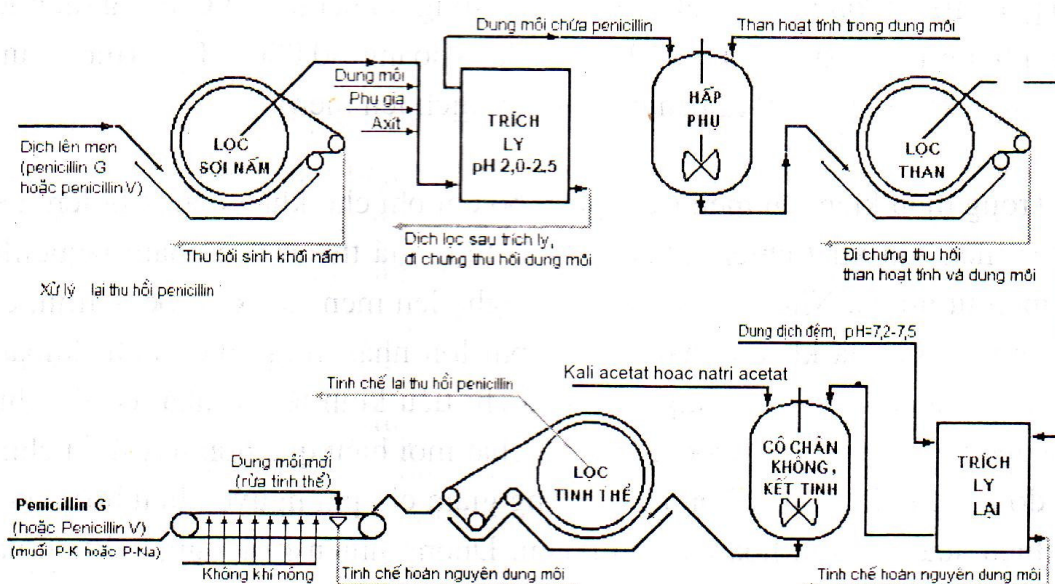
**Đặc điểm về thiết bị lên men:** quá trình lên men sản xuất penicillin ngày nay chủ yếu được tiến hành trong thiết bị lên men chìm chế tạo bằng nhôm thép chịu ăn mòn CT2 với khuấy trộn kiểu tuốcbin (gồm nhiều tầng cánh khuấy, kết hợp bố trí hệ vách dẫn dòng trong thùng). Công suất khuấy trộn tiêu hao được thiết kế khoảng 3kW/m<sup>3</sup>/giờ. Không khí nén đã vô khuẩn được cấp vào qua hệ ống phân phối kiểu vòng xoáy hay kiểu rẽ quạt đục lỗ lắp đặt sát dưới đáy (hay phía dưới cánh tuốcbin). Bên trong thiết bị được lắp đặt nhiều tầng ống trao đổi nhiệt kiểu vòng xoắn kết hợp đồng thời với trao đổi nhiệt qua thành thiết bị hai lớp vỏ, đảm bảo điều nhiệt hiệu quả trong suốt quá trình lên men. Dung tích thiết bị phổ biến trong khoảng 150-300m<sup>3</sup>, hệ số đổ đầy thường chọn khoảng 80%V (phụ thuộc vào kỹ thuật và thiết bị phá bọt). Thiết bị nhân giống sản xuất có dung tích khoảng 10%V thiết bị lên men, được thiết kế tương tự và thường được ghép cứng với thiết bị lên men. Toàn bộ thiết bị lên men sản xuất, thiết bị nhân giống lớn và hệ thống các trang thiết bị phụ trợ được thiết kế và lắp đặt đảm bảo có thể vệ sinh và thao tác vận hành theo chế độ vô khuẩn cao (tốt nhất nên bố trí sao cho có thể áp dụng chế độ thanh trùng đồng thời cho toàn bộ hệ thiết bị này). Các thông số kiểm tra quá trình lên men bao gồm: pH môi trường, nồng độ oxy hòa tan, nhiệt độ, hàm lượng sinh khối và tốc độ biến thiên lượng sinh khối, số lượng, kích thước và cấu trúc pellet, nồng độ các cấu tử cơ chất, nồng độ penicillin, thành phần khí thải và các chỉ tiêu kiểm tra về vi sinh vật. Việc giám sát và điều chỉnh quá trình lên men được xây dựng trên cơ sở khai thác cả hai kiểu tương tác trực tuyến (*online control*) và tương tác không phản hồi theo quy luật (*offline control*), phụ thuộc vào khả năng đáp ứng của hệ thiết bị hiện có. Đồng thời xu hướng máy tính hóa trong kiểm tra và giám sát quá trình lên men đang dần chiếm ưu thế trong sản xuất công nghiệp.

### 2.3.4. Hiệu quả kinh tế chung của quá trình lên men :

Năng lực sinh tổng hợp và tích tụ penicillin trong dịch lên men là kết quả của mỗi tương tác đồng thời của hàng loạt yếu tố công nghệ như: hoạt tính sinh tổng hợp của chúng, công nghệ lên men áp dụng, chất lượng nguyên liệu, đặc tính thiết bị và năng lực đáp ứng các yêu cầu công nghệ của thiết bị, chế độ giám sát và điều chỉnh các thông số công nghệ, năng lực và kỹ năng vận hành của công nhân.... Với nguồn cơ chất chính là glucoza và lên men theo phương pháp chìm, hệ số phân bổ nguyên liệu dự tính khoảng 25% glucoza được nấm mốc sử dụng để tổng hợp hệ sợi, 65% đường được sử dụng để duy trì sự sống sót của hệ sợi, còn lại chỉ khoảng 10% được nấm mốc sử dụng để tổng hợp penicillin. Hệ số sử dụng thức ăn nitơ và lưu huỳnh để tổng hợp penicillin tương ứng là 20% và 80%. Nồng độ penicillin G trong dịch lên men những năm 80 - 90 của thế kỷ XX đạt khoảng 80.000 UI/ml (tương ứng năng suất khoảng 40 - 50 kg penicillin G/ m<sup>3</sup> dịch lên men )

### 2.4. XỬ LÝ DỊCH LÊN MEN VÀ TINH CHẾ THU PENICILLIN TỰ NHIÊN:

Công đoạn xử lý dịch lên men và tinh chế thu penicillin tự nhiên được tóm tắt trong sơ đồ hình 2.9 , bao gồm các công đoạn chính sau đây:



Hình 2.9. Sơ đồ tóm tắt công đoạn xử lý dịch lên men thu penicillin tự nhiên

#### **2.4.1. Lọc dịch lên men :**

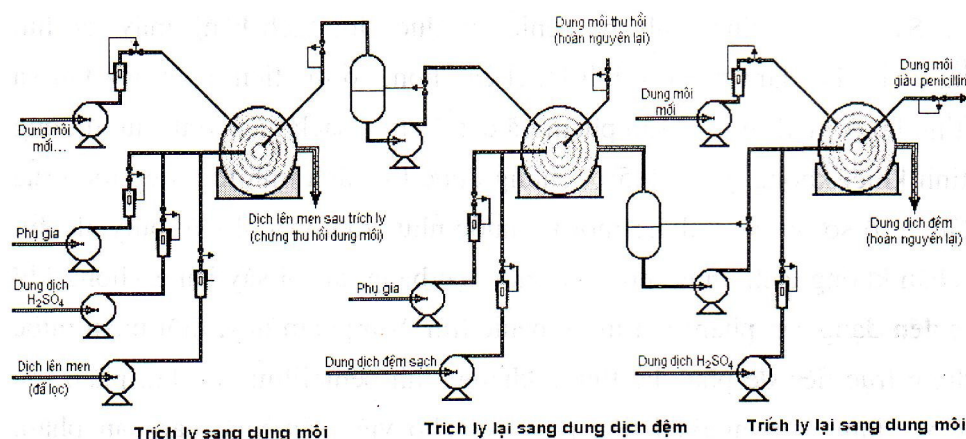
*Mục đích:* Penicillin là sản phẩm lên men ngoại bào. Vì vậy, ngay sau khi kết thúc quá trình lên men người ta thường tiến hành lọc ngay để giảm tổn hao do phân huỷ penicillin và giảm bớt khó khăn khi tinh chế, do các tạp chất tạo ra khi hệ sợi nấm tự phân.

*Thiết bị lọc:* phổ biến là thiết bị lọc hút kiểu băng tải hoặc kiểu thùng quay. Thông thường, người ta chỉ cần lọc một lần rồi làm lạnh dịch ngay để chuyển sang công đoạn tiếp theo. Chỉ trong những trường hợp rất đặc biệt mới cần phải xử lý kết tủa một phần protein và lọc lại dịch lần thứ hai. Hiện tượng tự phân hệ sợi nấm thường kéo theo hậu quả làm cho dịch khó lọc hơn.

*Thu hồi sinh khối nấm:* Phần sinh khối nấm được rửa sạch, sấy khô và sử dụng để chế biến thức ăn gia súc.

#### **2.4.2. Trích ly :**

Penicillin thường được trích ly ở dạng axít ra khỏi dịch lọc bằng dung môi amylacetat hoặc butylacetat ở pH = 2,0 - 2,5, nhiệt độ 0 - 3<sup>0</sup>C. Nhằm hạn chế lượng penicillin bị phân huỷ, quá trình trích ly được thực hiện trong thời gian rất ngắn trong thiết bị trích ly ngược dòng liên tục kiểu ly tâm nhiều tầng cánh. Đồng thời, trong thời gian trích ly cần giám sát chặt chẽ các thông số công nghệ như: nhiệt độ pH, độ vô khuẩn.... để hạn chế tổn thất do phân huỷ penicillin. Dịch lên men sau khi lọc được bơm trộn đồng thời với dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hoặc H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> loãng có bổ sung thêm chất chống tạo nhũ và bơm song song cùng với dung môi trích ly vào trong thiết bị. Tỷ lệ dịch lọc: dung môi thường chọn trong khoảng 4 - 10V dịch lọc /1V dung môi. Trong một số công nghệ, nhằm cải thiện chất lượng sản phẩm, người ta có thể áp dụng phương pháp trích ly hai lần dung môi, với lần đầu trích ly penicillin bằng amylacetat hoặc butylacetat; tiếp theo penicillin lại được trích ly ngược sang dung dịch đệm pH = 7,2 - 7,5, thường là dung dịch KOH loãng hoặc dung dịch NaHCO<sub>3</sub>; sau đó penicillin lại được trích ly sang dung môi lần thứ 2, với lượng dung môi ít hơn.(hình 2.10)



**Hình 2.10. Sơ đồ công nghệ trích ly 2 lần dung môi tinh chế penicillin**

### 2.4.3. Tẩy màu :

Để tẩy màu và loại bỏ một số tạp chất khác, người ta thường bổ sung trực tiếp chất hấp phụ vào dung môi chứa penicillin sau trích ly, sử dụng phổ biến nhất là than hoạt tính. Sau đó than hoạt tính được tách và rửa lại bằng sử dụng thiết bị lọc hút băng tải hoặc thiết bị lọc hút kiểu thùng quay. Phần than sau lọc được đưa đi chưng thu hồi dung môi và xử lý hoàn nguyên, phục vụ cho các mẻ sau.

### 2.4.4. Kết tinh, lọc, rửa và sấy thu penicillin tự nhiên:

Việc kết tinh penicillin V hay penicillin G dưới dạng muối có thể được thực hiện rất đơn giản, bằng cách bổ sung trực tiếp vào dung môi sau khi tẩy màu một lượng nhỏ kali acetat (hay natri acetat) hoặc người ta trích ly lại sang dung dịch KOH loãng (hay NaOH loãng), tiến hành cô chân không ở nhiệt độ thấp, sau đó bổ sung BuOH để penicillin tự kết tinh. Các thông số công nghệ có ảnh hưởng lớn đến hiệu quả kết tinh là : nồng độ penicillin, nồng độ muối acetat, pH dung môi hay pH dung dịch cô đặc, nhiệt độ kết tinh ... Sau khi kết tinh, tinh thể penicillin được lọc tách bằng máy lọc hút thùng quay. Để đảm bảo độ tinh khiết cao hơn, có thể tiến hành hòa tan và kết tinh lại penicillin. Khi sản phẩm đã đạt độ tinh sạch theo yêu cầu, thường độ tinh khiết không dưới 99,5%, chúng được lọc tách tinh thể; tiếp theo rửa và làm khô sơ bộ bằng dung môi kỵ nước như izopropanol hay butylalcohol; hút chân không tách dung môi trên máy lọc băng tải rồi sấy bằng không khí nóng đến dạng sản phẩm bột muối penicillin. Sản phẩm này, một phần được sử dụng trực tiếp để pha chế thuốc kháng sinh penicillin; còn lại, phần lớn được sử dụng làm nguyên liệu phục vụ cho việc sản xuất các sản phẩm penicillin và cephalosporin bán tổng hợp khác. Ngoài ra, để sản xuất ra các sản phẩm penicillin có độ tinh khiết rất cao, người ta cần phải sử dụng phối hợp thêm một số giải pháp công nghệ khác.

## 2.5. SẢN XUẤT CÁC $\beta$ -LACTAM BÁN TỔNG HỢP TỪ PENICILLIN G

### 2.5.1. Nhu cầu sản xuất các penicillin bán tổng hợp :

Tác dụng điều trị chính của penicillin và các kháng sinh khác thuộc họ  $\beta$ -lactam được xác định là: cấu trúc penicillin có nhiều điểm gắn gũi với dipeptit D-alanin-D-alanin, là hợp phần cấu trúc của lớp peptido-glucan thành tế bào. Do sự tương đồng về đặc tính và cấu trúc này làm cho hoạt tính các enzym tham gia vào quá trình tổng hợp tế bào bị biến đổi, các enzym này đã nhận "nhầm" cơ chất. Kết quả là phần thành tế bào mới tổng hợp với sự "nhầm lẫn" trên sẽ không được hình thành, làm cho thành tế bào của mầm bệnh chỉ có từng phần hay chúng hoàn toàn không có thành tế bào do đó chúng dễ dàng bị tự phân trong môi trường và bị các công cụ tự vệ của cơ thể bệnh nhân tiêu diệt. Đồng thời, các kháng sinh  $\beta$ -lactam còn liên kết đặc hiệu với một số protein trên màng tế bào chất (đến nay đã xác định được chín protein trên). Sự liên kết này đã làm "bất hoạt" và "hòa tan" các protein đặc hiệu trên màng, dẫn đến làm mất hoạt tính polymeraza và ATPaza (người ta đã xác định được trong môi trường kháng sinh chỉ có các D-alanin -cacboxylpeptidaza còn hoạt động và một số ACPaza này lại có hoạt tính B-lactamaza yếu). Ngoài ra, người ta còn phát hiện thấy ảnh hưởng của penicillin đến các chuyển hóa photpholipit trong tế bào.

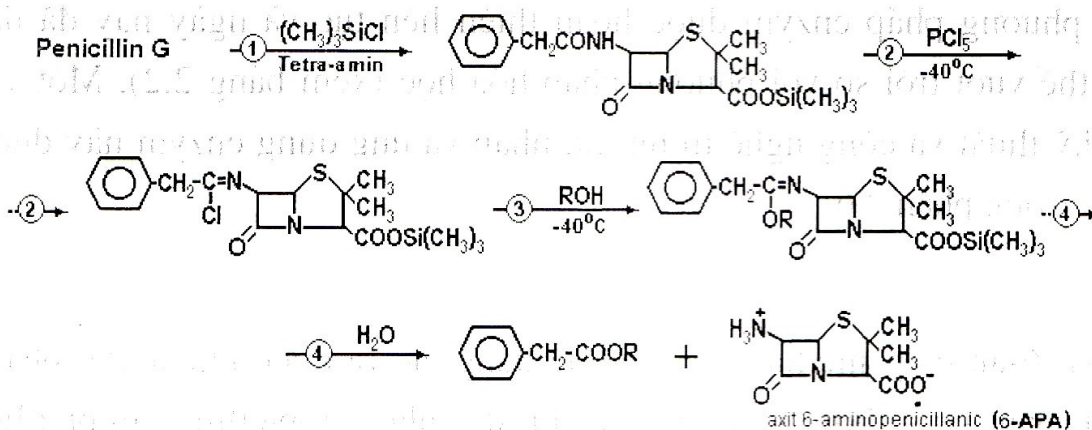
Tuy nhiên nhiều trường hợp điều trị với penicillin đã xuất hiện dấu kháng thuốc. Nguyên nhân chính của hiện tượng kháng penicillin này là chúng tổng hợp được một trong hai enzym penicillinaza và đặc biệt là enzym  $\beta$ -lactamaza. Gen mã hóa sinh tổng hợp enzym  $\beta$ -lactamaza được lưu giữ trên các plasmid (hoặc trasporon ). Vì vậy, cùng với thời gian điều trị, năng lực kháng thuốc của chúng sẽ trở nên thành thực. Để vô hiệu khả năng kháng thuốc nêu trên, về nguyên lý, giải pháp đơn giản hơn cả là làm vô hiệu khả năng tương tác của enzym với cơ chất bằng cách làm biến đổi cấu trúc phân tử penicillin.

Để tạo ra các penicillin khác nhau, trên nguyên tắc có thể hoàn thiện theo hướng lên men trực tiếp với các tiền chất tạo nhánh thích hợp để thu các penicillin mong muốn hay lên men không sử dụng tiền chất thu axit 6- aminopenicillanic làm nguyên liệu để tổng hợp ra các penicillin khác. Tuy nhiên, bằng con đường lên men trực tiếp cho đến nay người ta mới chỉ có khả năng lên men được một vài loại penicillin. Trong khi đó, con đường kinh tế hơn cả và được triển khai trong sản xuất lớn lại là chỉ lên men trực tiếp thu penicillin G (hoặc penicillin V) làm ra nguyên liệu, để từ đó tổng hợp ra penicillin bán tổng hợp khác. Ngoài ra, bằng con đường bán tổng hợp penicillin G hoặc penicillin V, có thể sản xuất ra một số dẫn xuất  $\beta$ -lactam có giá trị như các cepalosporin bán tổng hợp hay các penicillin có hoạt tính kìm hãm  $\beta$ -lactamaza.

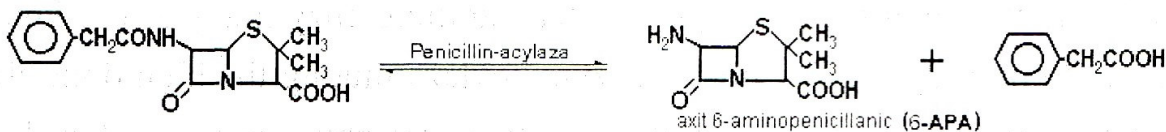
## 2.5.2 Sản xuất axit 6- aminopenicillanic và sản xuất penicillin bán tổng hợp

Axit 6- aminopenicillanic tuy không có hoạt tính kháng khuẩn, nhưng có thể sử dụng làm nguyên liệu để tổng hợp ra nhiều loại penicillin khác nhau và cả cephalosporin. Để sản xuất axit 6- aminopenicillanic, con đường hiệu quả hơn cả hiện nay là lên men sản xuất penicillin G (hoặc penicillin V); sau đó áp dụng phương pháp hóa học hay sử dụng enzym acylaza để phân cắt mạch nhánh bên xem sơ đồ hình 2.11.

Sơ đồ tổng hợp bằng phương pháp hóa học



Sơ đồ tổng hợp bằng phương pháp enzym



Hình 2.11. Sơ đồ tổng hợp axit 6- aminopenicillanic từ penicillin G

Phương pháp hóa học có hiệu suất chuyển hóa cao, tới 90-95%, và tốc độ phản ứng nhanh, song lại tiêu hao nhiều năng lượng, nhiều dung môi và chứa đựng nguy cơ ô nhiễm môi trường cao. Trong khi đó, phương pháp enzym, tuy hiệu quả chuyển hóa thấp hơn nhưng điều kiện phản ứng êm dịu và mang lại hiệu quả kinh tế cao hơn nên được triển khai phổ biến trong thực tiễn sản xuất công nghiệp. Đồng thời, cũng nhờ ưu thế trên, phương pháp enzym được hoàn thiện liên tục và ngày nay đã đạt được ưu thế vượt trội so với phương pháp hóa học (xem bảng 2.2).

**Bảng 2.2.. Phân bố chi phí trong sản xuất axit 6- aminopenicillanic  
(40tấn/năm theo hãng Snam Progetti)**

Phân bố chi phí	Phương pháp hóa học	Phương pháp enzym (chế phẩm enzym cố định trong triacetatcelluloza)	
		Sử dụng penicillin G tinh khiết	Sử dụng penicillin G thô
Penicillin V	43,72	46,01	39,65
Hóa chất	7,19	0,78	1,39
Chế phẩm enzym	---	2,67	2,67
Vật tư khác	4,64	0,91	0,91
Nhân công	3,12	3,05	3,95
Khấu hao thiết bị	6,16	4,99	3,85
Chi phí khác	2,28	3,18	2,90
<b>Tổng cộng</b>	<b>68,41</b>	<b>62,49</b>	<b>55,28</b>

### 2.5.3 Sản xuất axit 7- deminodeaxetoxy-cephalosporin (7-ADCA) và sản xuất cepalosporin bán tổng hợp

Cepalosporin là họ chất kháng sinh thuộc nhóm  $\beta$ -lactam với đặc tính quý nhờ ít bị kháng thuốc hơn penicillin và được đánh giá an toàn hơn cho người bệnh. Các sản phẩm Cepalosporin bán tổng hợp khác nhau đều được tổng hợp từ sản phẩm trung gian là axit 7- deminodeaxetoxy-cephalosporin (7-ADCA xem mục 3). Sản phẩm 7-ADCA này có thể được tổng hợp từ penicillin G, từ axit 6- aminopenicillanic hay từ cepalosporin C là (một sản phẩm lên men tự nhiên), trong đó đến cuối thế kỷ XX con đường hiệu quả kinh tế nhất vẫn là tổng hợp từ penicillin G theo sơ đồ 2.12

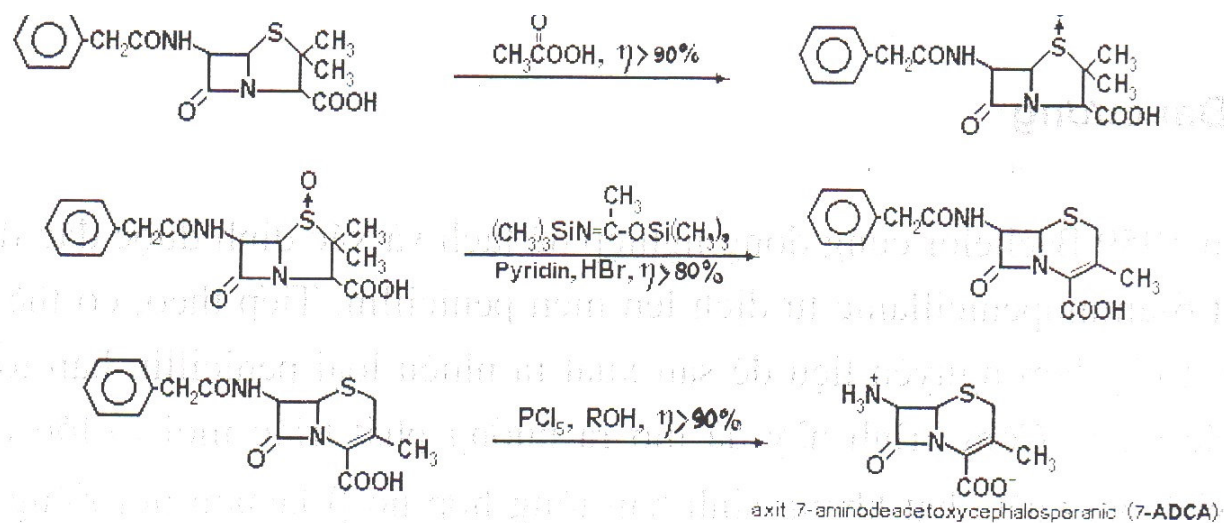
Từ sản phẩm 7-ADCA người ta dễ dàng acyl hóa bằng các mạch nhánh tương ứng để sản xuất ra các cepalosporin bán tổng hợp, trong đó bao gồm theo cả hai hướng là thay thế nhánh tại vị trí  $C_7$  (thí dụ như cephalacin,cephadrin, cephadroxil...), hay thay thế các đồng thời mạch nhánh tại cả hai vị trí  $C_3$  và  $C_7$  (như: cephalozin, cephatrizin, cefoperazon,cephamadol,cefotiam....)

### 2.5.4. Sản xuất các B-lactam bán tổng hợp các hoạt tính kìm hãm $\beta$ -lactamaza

Bên cạnh các ứng dụng nêu trên, axit 6- aminopenicillanic còn được sử dụng làm nguyên liệu để sản xuất một số chế phẩm penicillin bán tổng hợp có cả hoạt tính kìm hãm B-lactamaza (thí dụ như oxacillin,cloxacillin,dicloxacillin, flucloxacillin...),



hay kết hợp sử dụng axit clavunic hoặc olivanic làm mạch nhánh để làm tăng hiệu quả điều trị (hai axit này tuy có hoạt tính kháng sinh yếu nhưng có hoạt tính kìm hãm  $\beta$ -lactamaza (thí dụ như axit bromopenicillanic).



**Hình 2.12. Sơ đồ tổng hợp hóa học axit 7-ADCA từ penicillin G**

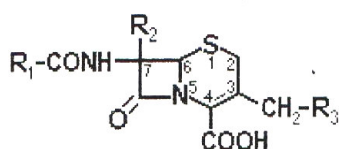
=

## CHƯƠNG 3

### CÔNG NGHỆ LÊN MEN CEPHALOSPORIN VÀ CEPHAMYCIN

#### 3.1. ĐẠI CƯƠNG

Cephalosporin và cephamycin thuộc họ chất kháng sinh có cấu trúc vòng chính gồm vòng  $\beta$ -lactam liên kết với vòng dihydrothiazin (hình 3.1). Ngày nay, người ta đã phát hiện được nhiều loại nấm, xạ khuẩn và vi khuẩn khác nhau có khả năng tổng hợp Cephalosporin; nhưng khả năng tổng hợp cephamycin mới tìm thấy ở xạ khuẩn và một vài chủng *Norcardia*.

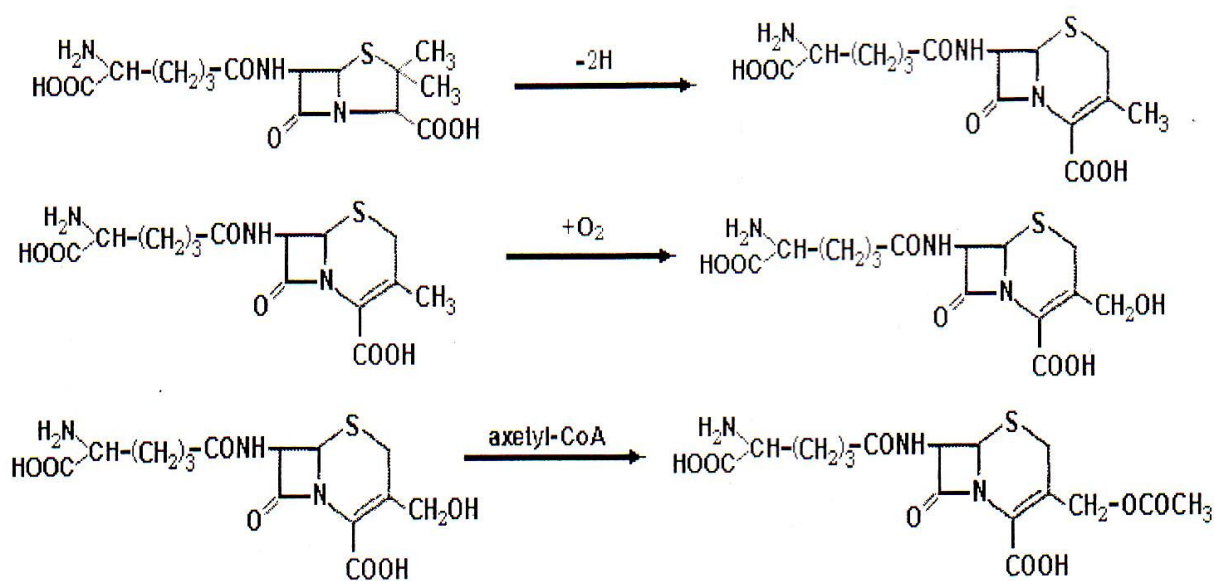


Tên kháng sinh	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Cephalosporin C	$\begin{array}{c} \text{HOOC} \\ \diagdown \\ \text{CH}-(\text{CH}_2)_3- \\ \diagup \\ \text{H}_2\text{N} \end{array}$	-H	-OCOCH <sub>3</sub>
Desacetoxycephalosporin C	$\begin{array}{c} \text{HOOC} \\ \diagdown \\ \text{CH}-(\text{CH}_2)_3- \\ \diagup \\ \text{H}_2\text{N} \end{array}$	-H	-H
C-1778a	$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_3-$	-H	-H
C-1778b	$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_3-$	-H	-OH
C-1778c	$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_3-$	-H	-OCOCH <sub>3</sub>
Cephamycin A	$\begin{array}{c} \text{HOOC} \\ \diagdown \\ \text{CH}-(\text{CH}_2)_3- \\ \diagup \\ \text{H}_2\text{N} \end{array}$	-OCH <sub>3</sub>	$\begin{array}{c} -\text{OCOC}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_2 \\   \\ \text{OCH}_3 \end{array}$
Cephamycin B	$\begin{array}{c} \text{HOOC} \\ \diagdown \\ \text{CH}-(\text{CH}_2)_3- \\ \diagup \\ \text{H}_2\text{N} \end{array}$	-OCH <sub>3</sub>	$\begin{array}{c} -\text{OCOC}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_2 \\   \\ \text{OCH}_3 \end{array}$
Cephamycin C	$\begin{array}{c} \text{HOOC} \\ \diagdown \\ \text{CH}-(\text{CH}_2)_3- \\ \diagup \\ \text{H}_2\text{N} \end{array}$	-OCH <sub>3</sub>	$\begin{array}{c} -\text{OCOC}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OSO}_3\text{H})_2 \\   \\ \text{OCH}_3 \end{array}$
C-2801X	$\begin{array}{c} \text{HOOC} \\ \diagdown \\ \text{CH}-(\text{CH}_2)_3- \\ \diagup \\ \text{H}_2\text{N} \end{array}$	-OCH <sub>3</sub>	$\begin{array}{c} -\text{OCOCH}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OSO}_3\text{H})_2 \\   \\ \text{OCH}_3 \end{array}$
Oganomycin G	$\begin{array}{c} \text{HOOC} \\ \diagdown \\ \text{CH}-(\text{CH}_2)_3- \\ \diagup \\ \text{H}_2\text{N} \end{array}$	-OCH <sub>3</sub>	$\begin{array}{c} \text{N-N} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{S} \quad \text{N} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Oganomycin F	$\begin{array}{c} \text{HOOC} \\ \diagdown \\ \text{CH}-(\text{CH}_2)_3- \\ \diagup \\ \text{H}_2\text{N} \end{array}$	-OCH <sub>3</sub>	$\begin{array}{c} \text{N-N} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{S} \quad \text{N} \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{SCH}_2\text{COOH} \end{array}$
Oganomycin H	$\begin{array}{c} \text{HOOC} \\ \diagdown \\ \text{CH}-(\text{CH}_2)_3- \\ \diagup \\ \text{H}_2\text{N} \end{array}$	-OCH <sub>3</sub>	$\begin{array}{c} \text{N-N} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{S} \quad \text{S} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$

**Hình 3.1. Một vài sản phẩm cephalosporin và cephamycin lên men tự nhiên**

Chất kháng sinh điển hình cho họ này là cephalosporin C được Newton và Abraham phát hiện năm 1956 (Nagarajan và đồng nghiệp phát hiện được cephamycin muộn hơn vào năm 1971). Ưu điểm lớn nhất Cephalosporin C là có tác dụng kháng khuẩn đối cả cầu khuẩn có hoạt tính  $\beta$ -lactamaza nhiều vi khuẩn Gram âm hầu như

không độc (liều tiêm dưới da LD<sub>50</sub> là 4g/kg thể trọng). Để sản xuất ra các Cephalosporin người ta thường sử dụng các chủng xạ khuẩn có hoạt tính cao của loài *cephalosporium acremonium*. Cơ chế quá trình tổng hợp Cephalosporin C cũng qua sản phẩm trung gian penicillin N rồi chúng được chuyển hóa tiếp tục theo sơ đồ 3.2 tiếp theo cephalosporin C qua quá trình metoxyl hoá tại vị trí C<sub>7</sub> sẽ hình thành cephamycin. Điểm đặc biệt của quá trình hình thành cephalosporin C là mạch nhánh  $\alpha$ - amino adipyl liên kết đặc hiệu hơn với vòng  $\beta$  - lactam (hoặc chính các chủng này không có enzym acyltransferaza), nên việc sử dụng các tiền chất tạo nhánh thay thế trong quá trình lên men nhằm thu nhận các cephalosporin khác hầu như không thu được hiệu quả đáng kể .

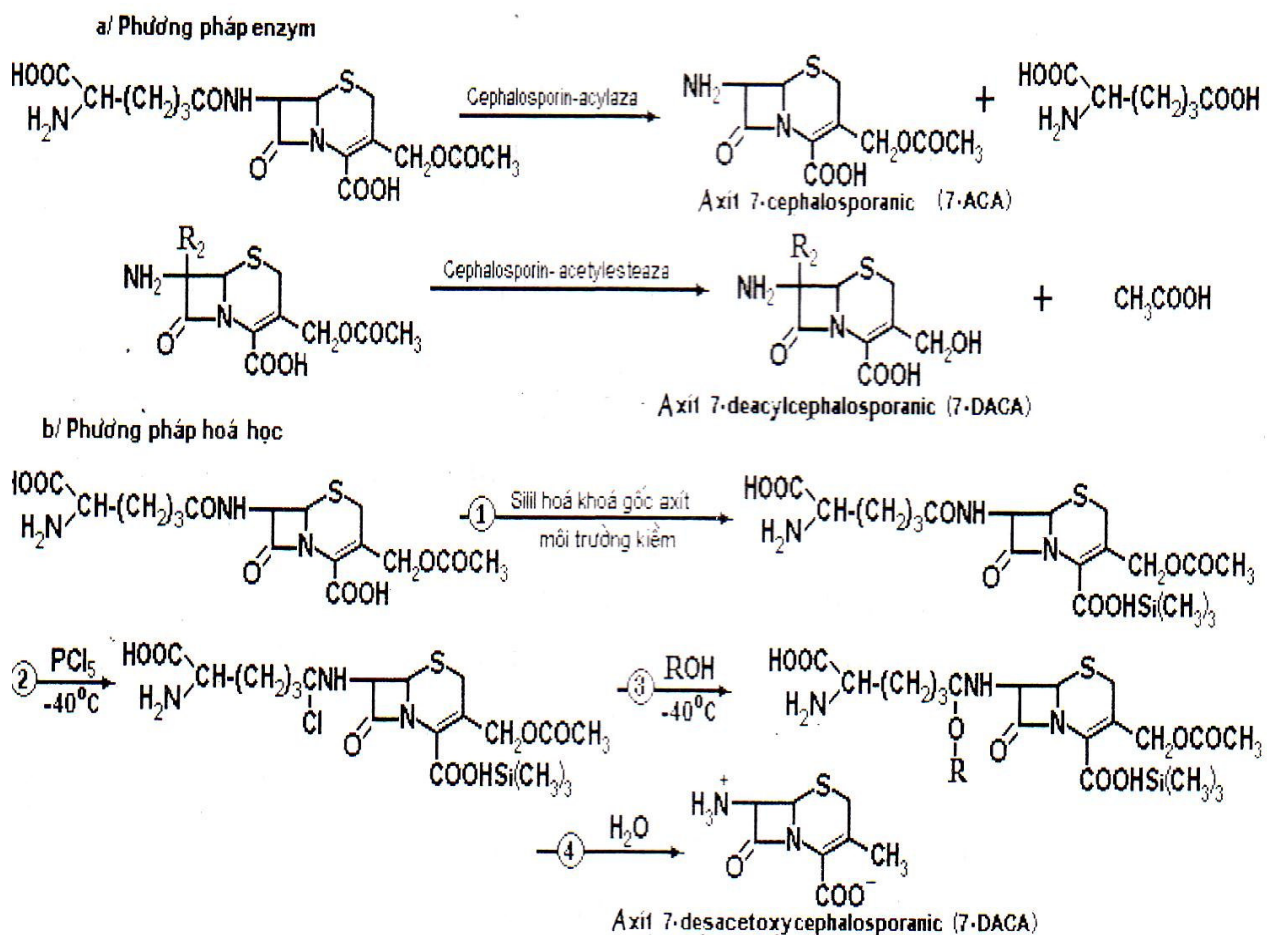


**Hình 3.2. Cơ chế tổng hợp cephalosporin C ( giai đoạn cuối từ penicillin N)**

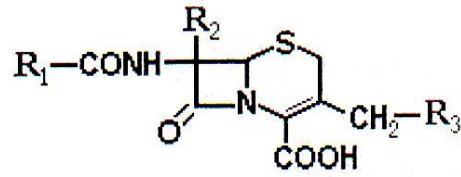
### 3.2. Điểm công nghệ lên men:

Cũng như với hầu hết các chất kháng sinh khác, công nghệ lên men sản xuất cephalosporin C được các hãng bảo mật. Về nguyên lý công nghệ, quá trình lên men cephalosporin C có nhiều điểm tương đồng với công nghệ lên men sản xuất penicillin, với việc sử dụng các chủng công nghiệp hoạt lực cao, thành phần môi trường và các thông số công nghệ lên men được tối ưu hóa... Sau đó, từ cephalosporin C, bằng phương pháp enzym hoặc phương pháp tổng hợp hóa học, có thể tổng hợp được axit 7-amino-cephalosporanic (7-ACA) hay axit 7-aminodeacetoxycephalosporanic (7-ADCA - hình 3.3). Từ sản phẩm trung gian này có thể sản xuất ra nhiều chế phẩm cephalosporin bán tổng hợp khác. Tuy nhiên, việc nghiên cứu hoàn thiện và triển khai sản xuất công nghiệp cephalosporin C gặp khó khăn hơn nhiều so với quá trình lên men sản xuất penicillin. Năng lực tích tụ cephalosporin (hay cephamycin) của các chủng gốc thường rất thấp và việc tuyển chọn, cải tạo hoạt tính chủng trong khoảng thời gian dài chưa tạo ra được các chủng có năng lực siêu tổng hợp cao như mong muốn. Đồng thời, các chủng lên men cephalosporin dường như không có hoạt tính enzym acyltransferaza nên việc sử dụng tiền chất tạo nhánh nhằm thay đổi phổ sản phẩm tạo thành trong quá trình lên men cephalosporin không mang lại kết quả đáng kể. Trong khi đó, bằng phương pháp hóa học từ penicillin G (hay penicillin V) người ta dễ dàng thu được axit 7-ADCA với hiệu quả kinh tế cao hơn so với từ cephalosporin C (hình 2.11). Đây cũng có thể là một trong những nguyên nhân làm cho việc nghiên cứu tìm kiếm cephalosporin hay cephamycin tự nhiên mới và việc hoàn thiện công nghệ lên men hai họ kháng sinh này trong khoảng thời gian dài không được triển khai mạnh mẽ như nhiều họ sản phẩm kháng sinh khác. Khoảng hai mươi năm gần đây, việc áp dụng các kỹ thuật tạo chủng tiên tiến, các phương pháp nghiên cứu hiện đại sử dụng trang thiết bị phân tích có độ chính xác cao đã cho phép khám phá ra cơ chế phân tử của quá trình lên men; phối hợp với việc áp dụng kỹ thuật vận hành và điều chỉnh quá trình lên men hiện đại, đã mở ra triển vọng mới cho nhóm sản phẩm này. Vì vậy, hướng nghiên cứu xây dựng và hoàn thiện công nghệ lên men cephalosporin tự nhiên trong vài năm gần đây đã lại được tiếp tục triển khai.

Các sản phẩm cephalosporin bán tổng hợp bao gồm cả nhóm sản phẩm acyl hóa gốc 7-amin và nhóm sản phẩm thay thế gốc acetoxy- ở vị trí C<sup>3</sup>; công thức hóa học của một số sản phẩm bán tổng hợp thương mại phổ dụng được giới thiệu trong hình 18. Về cấu trúc, cephalosporin và cephamycin cùng thuộc nhóm kháng sinh  $\beta$ -lactam nên chúng có cùng cơ chế tác dụng lên quá trình tổng hợp thành tế bào của mầm bệnh, tương tự như penicillin. Tuy nhiên, so với trường hợp penicillin, người ta đã phát hiện thấy có sự khác biệt về loại protein đặc hiệu trên màng liên kết với cephalosporin và cephamycin. Về hoạt tính kháng khuẩn, ngoài phổ kháng khuẩn rộng trên các vi khuẩn Gram dương, nhiều kháng sinh nhóm này tác dụng lên cả một số vi khuẩn Gram âm và một số khác tác dụng hiệu quả lên cả các chủng vi khuẩn có hoạt tính  $\beta$ -lactamaza điển hình.



Hình 3.3. Sơ đồ phản ứng biến đổi cephalosporin C thành axit 7-ADCA



<i>Danh pháp kháng sinh</i>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Cephalothin		-H	-OCOCH <sub>3</sub>
Cephalexin		-H	-H
Cephaloridin		-H	
Cefoxitin		-OCH <sub>3</sub>	-OCONH <sub>2</sub>
Cefuroxime		-H	-OCONH <sub>2</sub>
Cefotaxime		-H	-OCOCH <sub>3</sub>

Hình 3.4. Cấu trúc một số kháng sinh cephalosporin bán tổng hợp phổ dụng

## **CHƯƠNG 4**

### **CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT CÁC KHÁNG SINH KHÁC**

#### **1. CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT CÁC KHÁNG SINH CÓ NGUỒN GỐC TỪ XẠ KHUẨN**

##### **1.1. CÔNG NGHỆ LÊN MEN KHÁNG SINH NHÓM AMINOSID (MINOGLYCOSID)**

###### **1.1.1. Streptomycin**

###### **1.1.2. Neomycin**

##### **1.2. CÔNG NGHỆ LÊN MEN KHÁNG SINH NHÓM TETRACYLIN**

###### **1.2.1. Tetracyclin ( Acromycine, tetracin)**

###### **1.2.2. Oxytetracyclin ( terramycin...)**

##### **1.3. CÔNG NGHỆ LÊN MEN KHÁNG SINH NHÓM MACROLID**

###### **Erythomycin:**

###### **1.3.1. Đặc điểm chủng Streptomyces erythreus**

###### **1.3.2. Điều kiện sinh tổng hợp.**

###### **1.3.3. Chiết xuất**

##### **1.4. KHÁNG SINH CHỐNG NẤM CANDIDA: NYSTATINE**

#### **2. CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT KHÁNG SINH CÓ NGUỒN GỐC VI KHUẨN**

##### **3. CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT KHÁNG SINH KHÁNG NẤM**

**PHẦN 3.**  
**CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT VẮC XIN CHO NGƯỜI**  
**CHƯƠNG 7**  
**CƠ SỞ SINH HÓA CỦA CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT VẮC XIN**

1. Hệ thống miễn dịch của cơ thể:

1.1. Khái niệm:

**Miễn dịch** (hay **miễn nhiễm**) là tập hợp tất cả các cơ chế sinh học giúp cho một **cơ thể đa bào** giữ được sự liên kết giữa các **tế bào** và các **mô**, đảm bảo sự toàn vẹn của **cơ thể** bằng cách loại bỏ những thành phần bị hư hỏng cũng như các chất và sinh vật xâm hại. Chức năng bảo vệ cơ thể bao gồm hai loại cơ chế miễn dịch, lần lượt xuất hiện trong quá trình **tiến hóa** của các loài và liên hệ chặt chẽ với nhau ở các động vật bậc cao

1.2. Cơ chế bảo vệ cơ thể

1.3. Phân loại miễn dịch:

- **Miễn dịch tự nhiên** (hay miễn dịch không đặc hiệu), đáp ứng tức thì.
- **Miễn dịch thu được** (miễn dịch đặc hiệu), đáp ứng sau vài ngày với đặc điểm là khả năng "ghi nhớ".

Ở cấp độ **phân tử**, cả hai cơ chế đều có khả năng phân biệt ("nhận diện") các thành phần của cơ thể, tức cái "ta" với tất cả những phân tử khác gọi chung là cái "không ta".

**Miễn dịch đặc hiệu xuất hiện vào thời điểm phân kỳ giữa động vật có xương sống và động vật không xương sống cách đây 500 triệu năm. Miễn dịch tự nhiên có tính nguyên thủy hơn, cần thiết cho sự sinh tồn của mọi sinh vật.**

1.3.1. Miễn dịch tự nhiên

1.3.2. Miễn dịch tiếp thu ( Miễn dịch thu được)

- Miễn dịch thu được chủ động

- Miễn dịch thu được thụ động:

. Miễn dịch thu được thụ động tự nhiên: là trạng thái MD thu được do kháng thể ghép hoặc truyền từ sữa mẹ.



. Miễn dịch thu được thụ động nhân tạo là MD nhờ kháng thể chuyển từ bên ngoài do truyền kháng huyết thanh

1.4. Chất sinh miễn dịch và kháng nguyên:

**Bất kỳ một chất nào khi đưa vào cơ thể động vật ở điều kiện thích hợp gây ra đáp ứng MD đều được gọi là chất sinh miễn dịch.**

**Bất cứ chất nào khi gắn với thành phần đáp ứng miễn dịch ( kháng thể hoặc tế bào lympho hoặc cả hai) đều được gọi là kháng nguyên. ( nghĩa là các chất khi đưa vào cơ thể sẽ kích thích cơ thể tạo nên kháng thể.**

**Tất cả các chất sinh miễn dịch đều là kháng nguyên, song có một số chất được coi là kháng nguyên nhưng không gây đáp ứng MD. Ví dụ Hapten.**

**Tất cả các protein tự nhiên của động vật , thực vật và vi sinh vật ở trạng thái keo đều có tính kháng nguyên.**

**Các chất độc thực vật ( abin, robin, crotin, rixin, curxin), các chất độc động vật ( nọc rắn, nọc ong, nhện...),**

**Một số polysacarit vi sinh vật, các phức hợp protein với lipit, protein với polysacarit cũng có khả năng kích thích cơ thể để tạo thành kháng thể.**

**Dưới tác dụng của formalin hay nhiệt độ, các ngoại độc tố bị mất độc tính nhưng tính chất kháng nguyên hầu như vẫn còn giữ nguyên. Lúc này được gọi là anatoxin. Anatoxin được dùng phổ biến để gây miễn dịch chủ động cho người chống lại các bệnh như các bệnh Bạch hầu, uốn ván v..v.**

1.4.1. Điều kiện của một chất sinh MD:

- Tính lạ: Chất được gọi là kháng nguyên trước hết phải là một chất lạ đối với cơ thể, bởi vì bình thường cơ thể không đáp ứng bảo vệ với các chất bản thân. Chất càng lạ bao nhiêu khả năng kích thích tạo kháng thể càng mạnh bấy nhiêu.
- Khối lượng phân tử lớn: Kháng nguyên có KL phân tử > 10000 dalton. Nếu < 1000 dalton ( penicillin, progesteron, aspirin ...) thì không có tính sinh MD. Từ 1000 đến 6000 dalton ( insulin) có thể có hoặc không có khả năng đáp ứng MD.
- Cấu trúc phân tử phức tạp: Chất có cấu trúc phân tử càng phức tạp thì tính mD càng cao..VDb Poly lizin là 1 polyme có KL phân tử 3000 dalton, nhưng không gây đáp ứng MD vì có cấu trúc đơn giản, trong khi đó Hapten tuy có khối lượng phân tử nhỏ vf không có tính sinh MD, nhưng khi gắn với chất có KL phân tử cao ( như protein) lại trở thành một chất sinh MD.

Như vậy chất sinh MD nếu không đủ 3 yếu tố trên thì cần phải gắn với chất mang để làm tăng KL phân tử hoặc có mức độ phức tạp về cấu trúc.

**1.4.2. Tính đặc hiệu của kháng nguyên:**

Sự liên kết giữa kháng nguyên với kháng thể hay giữa kháng nguyên với tế bào lympho luôn mang tính đặc hiệu cao. Tính đặc hiệu này tương tự như giữa enzym với cơ chất, giữa là khớp với nhau như chìa với ổ khóa.

Kháng thể hay tế bào lympho không phải liên kết với toàn bộ kháng nguyên mà chỉ với một phần nhất định của kháng nguyên gọi là quyết định kháng nguyên hay là epitop. Kích thước của epitop khoảng 7x12x 35 Å<sup>0</sup> gồm 5-7 axit amin

Phần tương ứng của nó trên mỗi kháng thể gọi là vị trí kết hợp kháng nguyên hay là paratop. Paratop có kích thước tương tự

Phần tương ứng với quyết định kháng nguyên nằm trên tế bào lympho gọi là thụ thể. Chẳng hạn thụ thể của tế bào T là TCR ( T – cell receptor).

Mỗi epitop chỉ gắn đặc hiệu với một paratop của kháng thể hoặc hoặc TCR và chỉ sinh ra một dòng kháng thể đặc hiệu. Một kháng nguyên có nhiều epitop khác nhau sẽ tạo thành nhiều dòng kháng thể khác nhau tương ứng với từng epitop

Tính đặc hiệu trong liên kết giữa kháng thể với kháng nguyên được ứng dụng thành một phương tiện tầm soát các chất trong nhiều kỹ thuật chẩn đoán. Các kháng thể đặc hiệu đối với một kháng nguyên mong đợi có thể được gắn nhãn phóng xạ hay huỳnh quang hoặc các enzyme tạo màu rồi sử dụng như các "đầu dò" để tìm kiếm kháng nguyên đó.

Các ứng dụng nổi tiếng bao gồm immunoblot, ELISA và nhuộm hóa mô miễn dịch các tiêu bản hiển vi. Tốc độ, độ chính xác và sự đơn giản của các xét nghiệm trên đã thúc đẩy sự phát triển của các kỹ thuật chẩn đoán nhanh in vivo các bệnh, vi khuẩn và cả các chất ma túy. Xét nghiệm sự tương hợp các nhóm máu cũng trên cơ sở phản ứng kháng nguyên-kháng thể.

### 1.5. Kháng thể:

Kháng thể là các globulin xuất hiện trong máu của động vật khi đưa kháng nguyên vào cơ thể, có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đã kích thích sinh ra nó. Kháng thể được định nghĩa trên đây gọi là kháng thể MD ( Ig- Immunoglobulin) hay kháng thể đặc hiệu.

Kháng thể chủ yếu tìm thấy trong huyết thanh của động vật, vì vậy huyết thanh chưa kháng thể đặc hiệu kháng nguyên gọi là kháng huyết thanh.

Kháng thể còn tìm thấy ở trong các thể dịch khác của cơ thể, như sữa. Những kháng thể có trong sữa hay huyết tương của người và của động vật từ trước khi có sự tiếp xúc với kháng nguyên gọi là kháng thể tự nhiên hay kháng thể không đặc hiệu

2. Các tế bào tham gia vào hệ thống miễn dịch:

**Hệ thống miễn dịch gồm nhiều cơ quan và nhiều loại tế bào nằm rải rác khắp cơ thể, tác động qua lại nhau để dẫn đến đáp ứng MD cuối cùng.**

Ngay cả trước khi khái niệm miễn dịch được hình thành, nhiều thầy thuốc cổ đại đã mô tả những cơ quan mà về sau người ta chứng minh được là thuộc hệ miễn dịch. Các cơ quan chính của hệ miễn dịch gồm tuyến ức, lách, tủy xương, các mạch lympho, hạch lympho và các mô lympho thứ cấp (như các hạch amidân, V.A.) và da. Các cơ quan chính, tuyến ức và lách, đã được nghiên cứu đơn thuần về mặt mô học qua các tử thiêt. Ngoài ra, có thể dùng phẫu thuật lấy ra các hạch lympho và một số mô lympho thứ cấp để nghiên cứu khi bệnh nhân còn sống (sinh thiêt).

Nhiều tế bào thuộc hệ miễn dịch không liên kết với một cơ quan đặc biệt nào, mà chỉ tập trung hoặc lưu chuyển giữa nhiều mô trong khắp cơ thể.

Trong hệ thống MD có 2 loại tế bào chính là: Các tế bào lympho và các đại thực bào

**Tế bào chủ chốt tham gia vào đáp ứng MD là tế bào lympho, tổ chức có chứa tế bào lympho và tham gia vào đáp ứng MD gọi là tổ chức lympho.**

Lympho có nguồn gốc từ các tế bào nguồn, còn gọi là tế bào gốc, không biệt hóa, ở tủy xương. Từ tế bào nguồn, nhiều dòng tế bào có chức năng khác nhau được biệt hóa rồi sau đó trải qua một quá trình thành thực hay chín khi kết hợp với các tổ chức chuyên hóa.

3. Tính chất của miễn dịch:

3.1. Tính đặc hiệu: **Kháng nguyên nào thì kháng thể nấy. Mỗi kháng nguyên chỉ có thể kết hợp vừa khớp với một loại kháng thể đặc hiệu do chính nó kích thích tạo thành. Nó khớp với nhau như khóa với chìa. Tính đặc hiệu này do cấu trúc bề mặt các phân tử kháng nguyên và kháng thể quyết định.**

3.2. Tính ghi nhớ: **Sau khi tiếp xúc với kháng nguyên, cơ thể có thể hình thành đáp ứng miễn dịch nhớ. Nếu lần sau có dịp tiếp xúc với kháng nguyên thì cơ thể sẽ tạo một đáp ứng miễn dịch nhanh và mạnh hơn để diệt tác nhân gây bệnh**

## CHƯƠNG 8

### CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT VẮC XIN

#### 1. Khái niệm về vắc-xin

##### 1.1. Định nghĩa vắc-xin:

**Vắc-xin** là chế phẩm có tính **kháng nguyên** dùng để tạo **miễn dịch đặc hiệu** chủ động, nhằm tăng sức đề kháng của cơ thể đối với một (số) tác nhân gây bệnh cụ thể. Các nghiên cứu mới còn mở ra hướng dùng vắc-xin để điều trị một số bệnh (**vắc-xin liệu pháp**, một hướng trong các **miễn dịch liệu pháp**). Thuật ngữ vắc-xin xuất phát từ **vaccinia**, loại **virus** gây **bệnh đậu bò** nhưng khi đem chủng cho người lại giúp ngừa được **bệnh đậu mùa** (**tiếng Latinh** *vacca* nghĩa là "con bò cái"). Việc dùng vắc-xin để phòng bệnh gọi chung là **chủng ngừa** hay **tiêm phòng** hoặc **tiêm chủng**, mặc dù vắc-xin không những được cấy (chủng), tiêm mà còn có thể được đưa vào cơ thể qua đường miệng.



##### Chuẩn bị vắc-xin **cúm** để chủng ngừa

#### 1.2. Lịch sử và hướng phát triển của vắc-xin

**Edward Jenner** được công nhận là người đầu tiên dùng vắc-xin để ngừa bệnh cho con người ngay từ khi người ta còn chưa biết bản chất của các tác nhân gây bệnh (năm 1796). **Louis Pasteur** với các công trình nghiên cứu về vi sinh học và miễn dịch học đã mở đường cho những kiến thức hiện đại về vắc-xin.

Vào thế kỷ thứ nhất trước **Công nguyên**, vua **Mithridate VI** mỗi ngày đều uống một lượng nhỏ độc chất cho cơ thể quen dần nhằm đương đầu với nguy cơ bị ám sát. Chuyện kể rằng cách này đã tỏ ra hiệu quả vì về sau, khi Mithridate thất trận và tự sát, liều thuốc độc ông ta uống vào chẳng có ép phê gì.

Ở **Trung Quốc**, vào khoảng **thế kỷ thứ 10**, các thầy lang **Đạo giáo** đã bí mật dùng một kỹ thuật phòng **bệnh đậu mùa**. Đậu mùa là chứng bệnh hiểm nghèo, nếu không giết chết bệnh nhân thì nó cũng để lại những vết **seo** rõ trên **mặt**. Các thầy lang đã lấy vẩy seo của người bị bệnh (chứa mầm bệnh), cho vào một chiếc hộp kín rồi giữ ở nhiệt

độ nhất định trong một thời gian để giảm độc tính, sau đó nghiền nhỏ thổi vào mũi của người khỏe chưa từng mắc bệnh đậu mùa để ngừa bệnh.

Một phương pháp tương tự cũng được dùng ở Thổ Nhĩ Kỳ vào thế kỷ 18.

Bỏ qua những huyền thoại lẻ loi và không chắc chắn trên, vắc-xin đầu tiên gắn với tên tuổi của Edward Jenner, một bác sĩ người Anh. Năm 1796, châu Âu đang có dịch đậu mùa, Jenner đã thực hiện thành công thử nghiệm vắc-xin ngừa căn bệnh này. Kinh nghiệm dân gian cho thấy những nông dân vắt sữa bò có thể bị lây bệnh đậu bò, nhưng sau khi khỏi bệnh, họ trở nên miễn nhiễm đối với bệnh đậu mùa. Dựa vào đó, Jenner chiết lấy dịch từ các vết đậu bò trên cánh tay của cô bệnh nhân Sarah Nelmes rồi cấy dịch này vào cánh tay của cậu bé 8 tuổi khỏe mạnh cùng làng tên là James Phipps. Sau đó Phipps đã có những triệu chứng của bệnh đậu bò. 48 ngày sau, Phipps khỏi hẳn bệnh đậu bò, Jenner liền tiêm chất có chứa mầm bệnh đậu mùa cho Phipps, nhưng Phipps không hề mắc căn bệnh này. Cách làm của Jenner xét theo các tiêu chuẩn y đức ngày nay thật không ổn, nhưng rõ ràng đó là một hành động có tính khai phá: đưa trẻ được chủng ngừa đã đề kháng được bệnh.

Thời của Jenner, các virus vẫn chưa được khám phá, còn vi khuẩn tuy đã được tìm ra nhưng vai trò gây bệnh của chúng chưa được biết. Thời điểm 1798, khi Jenner công bố kết quả thí nghiệm của mình, người ta chỉ hình dung là có các "mầm bệnh" .  
gây nên sự truyền nhiễm

☞ Sau thí nghiệm thành công của Jenner, phương pháp chủng đậu được triển khai rộng rãi. Tính đến năm 1801, ở Anh đã có trên 100.000 người được chủng.

Tám mươi năm sau, Louis Pasteur nghiên cứu bệnh tả khi dịch tả đang tàn sát đàn gà. Ông cấy các vi khuẩn tả trong phòng thí nghiệm rồi đem tiêm cho gà: những con bị tiêm chết sạch. Mùa hè năm 1878, ông chuẩn bị một bình dung dịch nuôi cấy vi khuẩn dạng huyền phù, rồi để đó, đi nghỉ mát. Khi trở về, ông lại trích lấy huyền phù đó đem tiêm cho gà. Lần này thì bầy gà chỉ bị bệnh nhẹ rồi cả đàn cùng khỏe lại. Pasteur hiểu ra rằng khi ông đi vắng, đám vi khuẩn trong huyền phù đó đã bị biến tính, suy yếu đi. Ông bèn lấy vi khuẩn tả (bình thường) đem tiêm cho những con gà vừa trải qua thí nghiệm trên và những con chưa hề bị chích vi khuẩn. Kết quả là những con nào từng được chích vi khuẩn (biến tính) thì có khả năng đề kháng lại mầm bệnh, bọn còn lại chết hết. Qua đó, Pasteur đã xác nhận các giả thuyết của Jenner và mở đường cho khoa miễn dịch học hiện đại.

Từ đó, chủng ngừa đã đẩy lùi nhiều bệnh: triệt tiêu bệnh đậu mùa trên toàn cầu, thanh toán gần như hoàn toàn bệnh bại liệt, giảm đáng kể các bệnh sởi, bạch hầu, ho gà, bệnh ban đào, thủy đậu, quai bị, thương hàn và uốn ván v.v. Nguyên tắc vẫn không có gì thay đổi: gây miễn dịch bằng một vi khuẩn hoặc virus giảm độc lực, hoặc với một protein đặc hiệu có tính kháng nguyên để gây ra một đáp ứng miễn dịch, rồi tạo

một **trí nhớ miễn dịch** đặc hiệu, tạo ra hiệu quả đề kháng cho cơ thể về sau khi tác nhân gây bệnh xâm nhập với đầy đủ độc tính.

Người ta còn hướng tới triển vọng dùng vắc-xin để điều trị một số bệnh còn nan y như **ung thư**, **AIDS** v.v.

Tuy nhiên, nhiều bệnh vẫn còn đang thách thức con người, chưa có vắc-xin nào đủ hiệu quả để ngăn ngừa. Trong đó phải kể nhiều bệnh do **ký sinh trùng** (thí dụ **sốt rét**, **giun**, **sán**), **vi khuẩn (lao)**, **virus (cúm, sốt xuất huyết, AIDS** v.v.). Một số lý do có thể là các tác nhân gây bệnh biến đổi thường xuyên khiến cho miễn dịch không còn hữu hiệu hoặc thậm chí tấn công ngay vào **hệ miễn dịch** như trường hợp của **HIV** v.v. (Đã có lúc **bệnh lao** được đẩy lùi bằng nhiều biện pháp phối hợp (thuốc, vắc-xin và các biện pháp phòng ngừa khác), nhưng sự xuất hiện của AIDS đã làm cho dịch lao có dịp bùng phát, nhất là tại các nước đang phát triển.)

**Lần đầu tiên trong lịch sử, con người đã thanh toán được một căn bệnh hiểm nghèo. Ảnh chụp năm 1977, Ali Maow Maalin, người Somalia, được xem là bệnh nhân cuối cùng mắc bệnh đậu mùa**



**\* Một số loại vaccin đang được sử dụng ở Việt Nam:**

Trong chương trình tiêm chủng mở rộng ở nước ta có 6 loại vắc-xin được trình bày bằng bảng dưới đây:

**Lịch tiêm chủng các vaccin trong chương trình tiêm chủng mở rộng:**

Vaccin	Liều lượng	Đường tiêm chủng	Tuổi tiêm chủng
--------	------------	------------------	-----------------

<b>BCG</b> (phòng lao)	<b>0,1ml</b>	<b>Trong da (thường ở cánh tay trái)</b>	<b>Sơ sinh hoặc bất kỳ thời gian nào sau đó</b>
<b>SABIN</b> (phòng bại liệt)	<b>2 giọt</b>	<b>Uống</b>	<b>Sơ sinh và lúc 2, 3, 4 tháng tuổi. Trẻ &lt; 5 tuổi hàng năm uống 2 liều tăng cường cách nhau 1 tháng.</b>
<b>DPT</b> (phòng bạch hầu, ho gà, uốn ván).	<b>0,5ml</b>	<b>Tiêm bắp (thường ở đùi)</b>	<b>Lúc 2, 3, 4 tháng tuổi. Tiêm 1 mũi tăng cường sau khi tiêm mũi thứ ba 1 năm.</b>
<b>Sởi</b>	<b>0,5ml</b>	<b>Dưới da (thường ở cánh tay trái)</b>	<b>Lúc 9 tháng tuổi hoặc sớm nhất sau đó.</b>

Ngoài 6 loại vaccin trong chương trình tiêm chủng mở rộng kê trên, ở nước ta hiện nay còn có một số loại vaccin khác đang được sử dụng như : vaccin phòng bệnh uốn ván, vaccin phòng bệnh tả, vaccin phòng bệnh thương hàn, vaccin phòng bệnh nhiễm khuẩn do H. influenzae typ b, vaccin phòng bệnh viêm màng não do cầu khuẩn màng não nhóm A và C, vaccin phòng bệnh dại, vaccin phòng bệnh viêm gan virus B, vaccin phòng bệnh viêm não Nhật Bản.

### **1. Vaccin phòng bệnh uốn ván:**

Là loại vaccin giải độc tố. Có 2 loại: vaccin chỉ chứa giải độc tố uốn ván và vaccin phối hợp với vaccin phòng bạch hầu và ho gà (DPT). Giải độc tố của vi khuẩn uốn ván được hấp phụ với phosphat nhôm.

Vaccin được tiêm bắp mỗi mũi 0,5ml. Tạo miễn dịch cơ bản tiêm 2 mũi cách nhau 1 tháng. Sau 6 đến 12 tháng tiêm nhắc lại.

Đối với phụ nữ lứa tuổi sinh đẻ, ngoài 2 mũi tạo miễn dịch cơ bản, tiêm mũi thứ 3 cách mũi thứ 2 ít nhất 6 tháng hoặc khi có thai, tiêm mũi thứ 4 cách mũi thứ 3 ít nhất 12 tháng hoặc khi có thai lần sau.

Đối với phụ nữ có thai chưa tiêm vaccin uốn ván lần nào thì tạo miễn dịch cơ bản bằng 2 mũi cách nhau 1 tháng, mũi tăng cường tiêm trước khi sinh ít nhất 1 tháng.

## **2. Vaccin phòng bệnh tả:**

Vaccin phòng bệnh tả đang dùng ở nước ta là vaccin bất hoạt gồm sinh typ cổ điển, sinh typ Eltor và cả biến chủng O139. Vaccin dạng huyền dịch đưa vào cơ thể theo đường uống.

Đối tượng sử dụng: mọi lứa tuổi ở các vùng có dịch tả lưu hành.

## **3. Vaccin phòng bệnh thương hàn:**

Có 2 loại vaccin phòng bệnh thương hàn đang được sử dụng:

Vaccin polysaccharid của Pháp có tên là Typhim Vi. Vaccin Typhim Vi dùng cho trẻ trên 2 tuổi và người lớn, tiêm dưới da hoặc tiêm bắp. Vaccin sống giảm độc lực của Hàn Quốc có tên là Zerotyph. Vaccin Zerotyph dùng cho trẻ trên 3 tháng tuổi và người lớn, theo đường uống.

## **4. Vaccin phòng nhiễm khuẩn do H. influenzae:**

Đây là loại vaccin chế từ kháng nguyên vỏ của H.influenzae typ b. Vaccin của Pháp có tên Act-HiB là loại vaccin liên kết, thành phần gồm polysaccharid vỏ của H. influenzae typ b gắn với giải độc tố của vi khuẩn uốn ván.

Vaccin này được dùng cho trẻ từ 5 tuổi trở xuống theo đường dưới da hoặc tiêm bắp mỗi mũi 0,5ml. Trẻ dưới 6 tháng tuổi tiêm 3 mũi cách nhau 1 tháng. Trẻ 6 đến 12 tháng tuổi tiêm 2 mũi cách nhau 1 tháng. Trẻ từ 1 đến 5 tuổi chỉ tiêm 1 mũi.

## **5. Vaccin phòng bệnh viêm màng não do cầu khuẩn màng não nhóm A và nhóm C**

Vaccin này được sản xuất từ polysaccharid của cầu khuẩn màng não nhóm A và nhóm C. Vaccin được sử dụng cho trẻ từ 18 tháng tuổi trở lên. Tiêm dưới da hoặc tiêm bắp 1 mũi 0,5ml duy nhất.

## **6. Vaccin phòng bệnh dại:**

Có 2 loại vaccin phòng dại: vaccin chết và vaccin sống giảm độc lực. Vaccin hiện đang được sử dụng ở nước ta thuộc loại vaccin sống giảm độc lực, vaccin Fuenzalida và vaccin Verorab.

Vaccin dại chỉ tiêm cho người bị động vật nghi dại cắn (xem mục “Cách xử lý trường hợp bị chó nghi dại cắn” trong bài “Virus dại”). Với vaccin Fuenzalida, tiêm trong da 6 mũi cách nhật, mỗi mũi 0,1ml cho trẻ tới 15 tuổi, mỗi mũi 0,2ml cho người trên 15 tuổi. Với vaccin Verorab, tiêm dưới da hoặc tiêm bắp 5 mũi, mỗi mũi 0,5ml vào các ngày 0 (ngày bắt đầu tiêm), 3, 7, 14, 30; tùy ý tiêm nhắc lại 1 mũi 0,5ml vào ngày thứ 90.



## **7. Vacxin phòng bệnh viêm gan virus B**

Vacxin phòng bệnh viêm gan virus B có 2 loại: vacxin thể hệ 1 được sản xuất từ kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAg) có trong huyết tương người lành; vacxin thể hệ 2 sản xuất từ HBsAg được tạo ra nhờ công nghệ gen (ADN tái tổ hợp) trên nấm men.

Vacxin phòng bệnh viêm gan virus B được tiêm cho các đối tượng có nguy cơ cao nhiễm virus viêm gan B, từ trẻ sơ sinh đến người trưởng thành. Đối với trẻ em, tiêm dưới da hoặc tiêm bắp 3 mũi cách nhau 1 tháng, mỗi mũi 0,5ml, tiêm nhắc lại 0,5ml sau một năm. Đối với người lớn, tiêm 3 mũi mỗi mũi 1ml: mũi thứ hai cách mũi thứ nhất 1 tháng, mũi thứ 3 cách mũi thứ hai 5 tháng; sau 5 năm tiêm nhắc lại 1 mũi 1ml.

## **8. Vacxin phòng viêm não Nhật Bản:**

Vacxin phòng viêm não Nhật Bản thuộc loại vacxin virus bất hoạt. Vacxin này được tiêm dưới da, mỗi mũi 0,5ml cho trẻ dưới 5 tuổi, mỗi mũi 1ml cho trẻ từ 5 tuổi trở lên.

Để tạo miễn dịch cơ bản: tiêm 3 mũi. Tiêm nhắc lại mỗi năm 1 mũi ở vùng có dịch. Tiêm nhắc lại 4 năm 1 mũi ở vùng không có dịch.

### **\* Hướng phát triển các vacxin mới:**

Một số vacxin mới để phòng chống các nhiễm trùng do vi khuẩn, virus và ký sinh trùng đã và đang được thử nghiệm như vacxin phòng bệnh hủi, bệnh lỵ trực khuẩn, các nhiễm trùng do *S. pneumoniae*, virus Rota, ký sinh trùng sốt rét... Người ta cũng hy vọng trong thời gian không xa sẽ có vacxin phòng giang mai, lậu và HIV/AIDS.

Các vacxin phòng nhiễm khuẩn đường tiêu hoá đang được phát triển theo hướng nghiên cứu sản xuất các vacxin đưa vào cơ thể theo đường uống để kích thích đáp ứng miễn dịch tại chỗ. Cũng theo hướng kích thích đáp ứng miễn dịch tại chỗ, các nhà khoa học đang nghiên cứu các vacxin phòng nhiễm trùng đường hô hấp đưa vào cơ thể bằng cách khí dung.

Sự tiến bộ nhanh chóng trong khoa học kỹ thuật nói chung và trong công nghệ sinh học nói riêng đã tạo ra khả năng sản xuất các vacxin mới hoặc làm cho các vacxin đã có hoàn thiện hơn.

Kỹ thuật mới giúp cho sự hiểu biết đầy đủ hơn vai trò của các thành phần kháng nguyên trong quá trình kích thích cơ thể đáp ứng miễn dịch và nó đã tạo ra khả năng chiết tách tinh chế những thành phần hữu hiệu để đưa vào vacxin, vừa làm tăng hiệu lực vừa làm giảm các phản ứng không mong muốn. Công nghệ gen sẽ cho ra đời những loại vacxin nhiều ưu điểm vượt xa các vacxin cũ: rất tinh khiết, ít phản ứng phụ, hiệu lực tạo miễn dịch cao, sản xuất nhanh và giá thành thấp.

### **1.3. Nguyên lý sử dụng vacxin**

Sử dụng vacxin là đưa vào cơ thể kháng nguyên có nguồn gốc từ vi sinh vật gây bệnh hoặc vi sinh vật có cấu trúc kháng nguyên giống vi sinh vật gây bệnh, đã được bào chế đảm bảo độ an toàn cần thiết, làm cho cơ thể tự tạo ra tình trạng miễn dịch chống lại tác nhân gây bệnh.

Nói một cách khác: sử dụng vaccin là tạo miễn dịch chủ động nhân tạo.

Tình trạng miễn dịch mà cơ thể có được sau khi sử dụng vaccin là kết quả của sự đáp ứng miễn dịch đối với các thành phần kháng nguyên có trong vaccin. Cơ thể luôn luôn đáp ứng bằng cả miễn dịch dịch thể (miễn dịch qua trung gian kháng thể) và miễn dịch tế bào (miễn dịch qua trung gian tế bào), nhưng tùy từng loại vaccin, hiệu lực bảo vệ có thể do miễn dịch dịch thể, miễn dịch tế bào hoặc phối hợp cả hai loại. Ngoài miễn dịch đặc hiệu, vaccin còn có khả năng tăng cường cả miễn dịch không đặc hiệu như làm tăng quá trình thực bào nhờ kháng thể đóng vai trò là yếu tố opsonin đặc hiệu, nhờ lymphokin hoạt hoá đại thực bào...

#### **1.4. Cơ chế hoạt động của vắc-xin**

Hệ miễn dịch nhận diện vắc-xin là vật lạ nên hủy diệt chúng và "ghi nhớ" chúng. Về sau, khi tác nhân gây bệnh thực thụ xâm nhập cơ thể, hệ miễn dịch đã ở tư thế sẵn sàng để tấn công tác nhân gây bệnh nhanh chóng hơn và hữu hiệu hơn (bằng cách huy động nhiều thành phần của hệ miễn dịch, đặc biệt là đánh thức các tế bào lympho nhớ). Đây chính là các ưu điểm của đáp ứng miễn dịch đặc hiệu.

#### **1.5. Đặc tính cơ bản của một vaccin**

##### **1.5.1. An toàn**

Một vaccin lý tưởng khi sử dụng sẽ không gây bệnh, không gây độc và không gây phản ứng. Sau khi sản xuất vaccin phải được cơ quan kiểm định nhà nước kiểm tra chặt chẽ về mặt vô trùng, thuần khiết và không độc.

- **Vô trùng:** Vaccin không được nhiễm các vi sinh vật khác, nhất là các vi sinh vật gây bệnh.
- **Thuần khiết:** Ngoài kháng nguyên đưa vào để kích thích cơ thể đáp ứng miễn dịch chống vi sinh vật gây bệnh, không được lẫn các thành phần kháng nguyên khác có thể gây ra các phản ứng phụ bất lợi
- **Không độc:** Liều sử dụng phải thấp hơn rất nhiều so với liều gây độc. Tuy nhiên, không có vaccin nào đạt được độ an toàn tuyệt đối. Về nguyên tắc, vaccin phải đảm bảo đủ độ an toàn. Song trên thực tế không thể đạt được mức độ an toàn tuyệt đối. Tất cả các vaccin đều có thể gây ra phản ứng phụ ở một số người.

##### ***Phản ứng tại chỗ:***

Những phản ứng nhẹ thường gặp sau tiêm chủng là nơi tiêm có thể hơi đau, mẩn đỏ, hơi sưng hoặc nổi cục nhỏ. Những phản ứng này sẽ mất đi nhanh chóng sau một vài ngày, không cần phải can thiệp gì. Nếu tiêm chủng không đảm bảo vô trùng, thì nơi tiêm chủng có thể bị viêm nhiễm, làm mủ.

##### ***Phản ứng toàn thân:***

Trong các phản ứng toàn thân, sốt hay gặp hơn cả, khoảng từ 10 đến 20 %. Sốt thường hết nhanh sau một vài ngày. Co giật có thể gặp nhưng với tỷ lệ rất thấp, khoảng 1 phần vạn, hầu hết khỏi không để lại di chứng gì. Một số vaccin có thể gây ra phản ứng nguy hiểm hơn, trong đó có sốc phản vệ, tuy nhiên rất hiếm gặp.

Khi bàn về những phản ứng do vaccin, rất cần phải nhấn mạnh rằng mức độ nguy hiểm do vaccin nhỏ hơn rất nhiều so với mức độ nguy hiểm do bệnh nhiễm trùng tương ứng gây ra. Thí dụ, tỷ lệ biến chứng nguy hiểm do bệnh ho gà gấp hàng trăm đến hàng nghìn lần phản ứng nguy hiểm do vaccin bạch hầu - ho gà - uốn ván gây ra.

Khi cân nhắc để quyết định xem một vaccin nào đó có được đưa vào sử dụng hay không, cần phải so sánh giữa mức độ phản ứng do vaccin và tính nguy hiểm của bệnh nhiễm trùng tương ứng.

### **1.5.2. Hiệu lực:**

Vaccin có hiệu lực lớn là vaccin gây được miễn dịch ở mức độ cao và tồn tại trong một thời gian dài. Hiệu lực gây miễn dịch của vaccin trước hết được đánh giá trên động vật thí nghiệm, sau đó trên thực địa.

#### ***Trên động vật thí nghiệm:***

Cách thứ nhất, đánh giá mức độ đáp ứng miễn dịch thông qua việc xác định hiệu giá kháng thể hoặc xác định mức độ dương tính của phản ứng da. Cách đánh giá này chưa cho biết hiệu lực bảo vệ, mới chỉ cho biết mức độ đáp ứng miễn dịch của cơ thể động vật đối với loại vaccin thử nghiệm. Cách thứ hai, xác định tỷ lệ động vật đã được tiêm chủng sống sót sau khi thử thách bằng vi sinh vật gây bệnh.

#### ***Trên thực địa:***

Dù đã được cơ quan kiểm định nhà nước kiểm tra và đã được đánh giá trên động vật, trước khi đưa ra tiêm chủng rộng rãi, vaccin đều phải được thử nghiệm trên thực địa (field test): Vaccin được tiêm chủng cho một cộng đồng, theo dõi thống kê tất cả các phản ứng phụ và đánh giá khả năng bảo vệ khi mùa dịch tới.

Ngoài 2 tiêu chuẩn trên, để chọn một vaccin tiêm chủng, người ta còn quan tâm đến giá thành và tính thuận lợi trong việc tiến hành tiêm chủng.

**1.5.3. Tính kháng nguyên:** Người ta gọi khả năng kích thích cơ thể tạo thành kháng thể là tính kháng nguyên. Tính kháng nguyên có thể mạnh hay yếu. Kháng nguyên mạnh là kháng nguyên khi đưa vào cơ thể một lần đã sinh ra nhiều kháng thể, còn kháng nguyên yếu là những chất phải đưa vào nhiều hoặc phải kèm theo một tá dược mới sinh được một ít kháng thể

### **1.5.4. Tính miễn dịch:**

Vaccin gây miễn dịch bằng một vi khuẩn hoặc virus giảm độc lực, hoặc với một [protein](#) đặc hiệu có tính [kháng nguyên](#) để gây ra một [đáp ứng miễn dịch](#), rồi tạo một [trí nhớ miễn dịch](#) đặc hiệu, tạo ra hiệu quả đề kháng cho cơ thể về sau khi tác nhân gây bệnh xâm nhập với đầy đủ độc tính.

## **1.6. Phân loại vắc-xin**

Vắc-xin có thể là các [virus](#) hoặc [vi khuẩn](#) sống, giảm độc lực, khi đưa vào cơ thể không gây bệnh hoặc gây bệnh rất nhẹ. Vắc-xin cũng có thể là các vi sinh vật bị bất hoạt, chết hoặc chỉ là những sản phẩm tinh chế từ vi sinh vật.

### **1.6.1. Vắc xin thế hệ thứ 1:**

- **Vắc-xin bất hoạt** ( vắc-xin vi khuẩn chết) là các vi sinh vật gây bệnh bị giết bằng **hóa chất** hoặc bằng **nhiệt**. Thí dụ: các vắc-xin chống **cúm**, **tả**, **dịch hạch** và **viêm gan siêu vi A**.

**Ưu điểm**: An toàn hơn vì các vi sinh vật không còn khả năng phục hồi dạng độc

**Nhược điểm**: - Tính miễn dịch kém hơn, hầu hết các vắc-xin loại này chỉ gây đáp ứng miễn dịch không hoàn toàn và ngắn hạn, cần phải tiêm nhắc nhiều lần.

- Đắt hơn

- **Vắc-xin vi khuẩn, virus sống, giảm độc lực** là vắc-xin chứa toàn bộ tế bào vi khuẩn hoặc vi rus được nuôi cấy dưới những điều kiện đặc biệt nhằm làm giảm hoạt lực, giảm đặc tính độc hại của chúng.

**Ưu điểm**: Có khả năng tạo đáp ứng miễn dịch cao do chúng nhân lên theo chu kỳ thời gian trong cơ thể. Vắc-xin điển hình loại này thường gây được đáp ứng miễn dịch dài hạn và là loại vắc-xin được ưa chuộng dành cho người lớn khỏe mạnh. Các vắc-xin ngừa bệnh **sốt vàng**, **sởi**, **bệnh ban đào** và **quai bị** đều thuộc loại này.

Vắc-xin sống ngừa **bệnh lao** không phải là dòng **vi khuẩn lao** gây bệnh, mà là một dòng lân cận được gọi là **BCG**.

**Nhược điểm**: Các vắc-xin loại này có thể gây nguy hiểm vì chúng có thể không ổn định và có thể trở lại dạng độc gây bệnh. Ví dụ , Vắc-xin bại liệt có thể gây chứng bại liệt cho trẻ được tiêm chủng với tỉ lệ  $3/10^6$  (tại Mỹ, theo Girard,1985). Tiêm chủng vắc-xin đậu mùa có thể gây viêm não tỉ lệ  $5/10^6$  (tại Mỹ, theo Girard,1985).

- **Vắc-xin có nguồn gốc từ độc tố anatoxin**: Ngoài vắc xin chứa toàn bộ tế bào vi sinh vật, một số thành phần tiết ra của chúng cũng có khả năng kích thích miễn dịch đã được biết như các độc tố (toxoid). Vắc-xin loại này chứa các độc tố đã làm bất hoạt ( gọi là giải độc tố hay anatoxin). Các độc tố được chế tạo thành sau khi đã được ủ với formalin cho đến khi mất độc tính. Ví dụ như vắc-xin giải độc tố uốn ván hay bạch hầu.

#### **Phối hợp vacxin:**

Mục đích chính của việc phối hợp vacxin là làm giảm bớt số mũi tiêm chủng hoặc làm giảm bớt số lần tổ chức tiêm chủng.

Có hai loại phối hợp vacxin:

- Tiêm chủng vacxin phối hợp (trộn các vacxin với nhau, tiêm chủng cùng một lần, cùng một đường).

- Tiêm chủng nhiều vacxin riêng biệt trong cùng một thời gian, có thể ở các vị trí khác nhau hoặc theo những đường khác nhau.

Phối hợp vacxin phải đảm bảo giữ được hiệu lực tạo miễn dịch và không gây ra tác hại gì. Hiệu lực tạo miễn dịch đối với mỗi thành phần vacxin ít nhất phải bằng

khi chúng được tiêm chủng riêng rẽ. Một số trường hợp khi phối hợp vaccin sẽ tạo ra được đáp ứng miễn dịch mạnh hơn. Ngược lại có những trường hợp phối hợp không hợp lý làm giảm hiệu lực tạo miễn dịch. Sự phối hợp vaccin hợp lý sẽ không làm tăng tỷ lệ phản ứng phụ. Nghĩa là độ an toàn vẫn được đảm bảo như khi chúng được tiêm chủng riêng rẽ ở những thời gian khác nhau.

### 1.6.2. Vaccin thể hệ thứ 2:

Vaccin thể hệ thứ 2 và thể hệ thứ ba đều là vaccin tái tổ hợp sẽ thay thế hoàn toàn vaccin cổ điển còn được gọi là subunit vaccin. Đó là loại vaccin chỉ sử dụng những antigen của vi sinh vật (subunit) thích hợp nhất để kích thích tạo đáp ứng miễn dịch mạnh nhất. Với công nghệ gen hiện đại, các antigen này được tổng hợp bằng cách cắt đoạn gen tổng hợp nên protein đặc trưng cho vi sinh vật gây bệnh, ghép gen này vào bộ gen của vi khuẩn, của nấm men khác hay tế bào nuôi cấy để tạo ra protein đặc hiệu cho mầm bệnh, dùng protein này để tiêm chủng tạo miễn dịch đặc hiệu. Ưu điểm của vaccin loại này là:

- Kháng nguyên sẽ dùng để kích thích miễn dịch được phân lập từ phần lành tính, không gây bệnh của vi sinh vật gây bệnh, và được tổng hợp bằng các tế bào vi sinh vật hay động vật đã được lắp ráp gen, đảm bảo được tính an toàn trong sản xuất
- Dạng vaccin này an toàn vì ít chất lạ hơn và không chứa toàn bộ gen của vi sinh vật nguyên thủy và không tái sản xuất trong cơ thể nhận, ít tác dụng phụ, khả năng miễn dịch cao.
- Giảm giá thành sản xuất, vì thay thế được các công đoạn đắt tiền bao gồm môi trường nuôi cấy mô động vật hoặc phôi bằng các môi trường nuôi cấy vi sinh vật thông thường, tương đối đơn giản. Ngoài ra không phải trang bị tốn kém cho vấn đề đảm bảo tính an toàn cao (ví dụ vaccin thông dụng chống bệnh lở mồm long móng thường có giá thành cao do sản xuất đòi hỏi nhà xưởng phải an toàn). Giá thành bảo quản và vận chuyển thấp nhờ giảm được các yêu cầu về làm lạnh và đông khô.
- Tránh được việc phải thử nghiệm tính an toàn trên qui mô lớn, vì vaccin không chứa tác nhân gây bệnh

Một điển hình của vaccin dạng này là vaccin phòng viêm gan virus B thể hệ II. Đó là vaccin tạo bằng cách lây nhiễm virus viêm gan B vào tế bào chủ cho virus sản xuất kháng nguyên. Sau đó tách chiết và gây bất hoạt virus để tạo vaccin. Hạn chế là kỹ thuật chiết tách kháng nguyên phức tạp và tốn kém.

( ADN tái tổ hợp là ADN lai tìm được in-vitro (trong ống nghiệm) bằng cách tổ hợp hai nguồn ADN thuộc hai loài khác nhau.)

### 1.6.3. Vaccin thể hệ thứ 3:

Là vaccin tái tổ hợp trong đó các antigen đặc hiệu được tổng hợp từ ADN của vi sinh vật được phối hợp với các tá dược làm gia tăng tính miễn dịch.

**Miễn** Là vắc-xin tái tổ hợp trong đó các antigen đặc hiệu được tổng hợp từ ADN của vi sinh vật được phối hợp với các tá dược làm gia tăng tính miễn dịch.

**Miễn dịch gia tăng:** là cách để làm tăng mức kháng thể vì làm kích thích tế bào nhớ (stimulating the memory cells). Một số hợp chất có khả năng làm gia tăng hiệu quả của vắc-xin vius hoặc vắc-xin toxoid do làm gia tăng sự kìm chế kháng nguyên trong hệ thống bạch huyết. Các chất này được gọi là các chất hỗ trợ (Adjuvant).

**Các chất hỗ trợ:** Đối với vắc-xin toxoid dùng adjuvant gồm có aluminum sunfate và aluminum hydroxid, còn đối với vắc-xin vius dùng dầu vô cơ và dầu phộng.

Cơ chế tác dụng: một phần các chất adjuvant sẽ liên kết với kháng nguyên và sẽ làm kháng nguyên dễ bị đánh bắt bởi macrophage, đồng thời có thể làm cho các lymphocytes nhận diện các kháng nguyên đã liên kết một cách hiệu quả hơn các kháng nguyên ở dạng hoà tan

Có 3 vấn đề kỹ thuật quan trọng cần được giải quyết:

- Cần phải nhận biết được antigen đặc hiệu cao có tác dụng kích thích sự miễn dịch.
- Việc nuôi tế bào sống phải tái tạo lại được cấu trúc các antigen cần sản xuất.
- Kích thước của antigen sau đó phải được tăng lên để thúc đẩy sự thực bào và đáp ứng miễn dịch.

Phương pháp này dùng để tổng hợp vắc-xin ngừa vius viêm gan là một subunit chế từ kháng nguyên bề mặt (HbsAg), tổng hợp trong tế bào nấm men hay động vật nuôi cấy đã lắp ráp gen (Tiollais, 1984, Giard, 1985); Chế phẩm đã được tinh chế, loại bỏ các protein và các đoạn ADN của chính tế bào chủ. Vắc-xin này có ưu điểm là không chế tạo từ máu người đã nhiễm vius như trước đây nên tránh được tiếp xúc với máu nhiễm HIV. (Virus viêm gan B có vỏ ngoài lipoprotein. Kháng nguyên bề mặt là protein chính của vỏ ngoài, được phát hiện trong máu người bị nhiễm: Vào năm 1963, người ta đã phát hiện trong huyết thanh bệnh nhân ưa chảy máu một kháng thể tác dụng được với kháng nguyên (virus), đến năm 1968, nó được xác định là kháng nguyên bề mặt của huyết thanh bệnh nhân viêm gan B (gọi là HbsAg)

Một vắc-xin khác là vắc-xin sỏi thể hệ mới được điều chế ở trung tâm nghiên cứu vi sinh học ứng dụng (Porton Down nước Anh) với sự hợp tác của trường Đại học Nữ Hoàng (Belfast) có chứa hai thành phần kháng nguyên, một ngưng kết tố hồng cầu và một protein liên kết, cả hai được tổng hợp bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN. Đó còn gọi là vắc-xin đa trị. Một vắc-xin khác là vắc-xin dịch tả được sản xuất từ những genes tạo toxin của vi khuẩn dịch tả đã được triển khai sản xuất từ năm 1993.

#### **1.6.4. Dạng kháng – kháng thể vắc-xin (Anti-idiotypic vaccines):**

Một hướng mới trong điều chế là dùng các kháng –kháng thể làm vắc-xin. Kháng – kháng thể đóng vai trò nhái lại cấu trúc của kháng thể đã được antigen từ vi sinh vật tạo thành nhưng chúng an toàn hơn. Nguyên tắc sản xuất vắc-xin này như sau:

- Đầu tiên sản xuất kháng thể chống lại kháng nguyên Ab1. Kháng thể loại này gọi là diotypic.
- Sau đó diotypic được tiêm vào thú để tạo kháng thể Ab2 ( gọi là anti diotypic Ab2). Trong cấu trúc của kháng- kháng thể có phần trùng với kháng nguyên. Ab2 bây giờ có vai trò như một antigen xác định nhưng đơn giản hơn so với antigen nguyên thủy ban đầu và được dùng làm vacxin.
- Cơ thể nhận được vắc-xin chứa Ab2 sẽ đáp ứng tạo kháng thể Ab3.
- Nếu sau đó hệ miễn dịch tiếp xúc với antigen nguyên thủy, Ab3 sẽ phản ứng với antigen, phá huỷ hoặc làm mất hoạt tính của chúng.

#### **Ưu điểm:**

- Không phải tiêm vi sinh vật sống hoặc chết vào cơ thể.
- Vắc-xin này chuyên biệt cao vì chống lại trực tiếp phần antigen đặc trưng một cách chuyên biệt nhất.
- Có một vài kháng nguyên không thể kích thích hệ thống miễn dịch của trẻ sơ sinh nung vắc-xin loại này chứa protein có thể cho một đáp ứng miễn dịch ở trẻ em một cách nhanh chóng
- Vắc-xin này có thể nhận biết vị trí nhận trên tế bào. Vì vậy có thể dùng để khoá sự tấn công của virus trên tế bào. Đây cũng là một hướng để sản xuất vắc-xin kháng HIV.

Một vấn đề quan trọng trong sản xuất kháng – kháng thể vắc-xin là nguồn idiotipic antibody. Trong đó nguồn kháng thể đơn dòng từ tế bào người sẽ tốt hơn từ tế bào chuột.

### **1.6.5. HUYẾT THANH MIỄN DỊCH**

#### **Nguyên lý sử dụng huyết thanh:**

Sử dụng huyết thanh là đưa vào cơ thể kháng thể có nguồn gốc từ người hoặc động vật, giúp cho cơ thể có ngay kháng thể đặc hiệu chống lại tác nhân gây bệnh.

Nói một cách khác: sử dụng huyết thanh là tạo miễn dịch thụ động nhân tạo.

#### **Nguồn kháng thể:**

##### **\* Bào chế từ huyết thanh động vật:**

Trước hết phải gây miễn dịch cho động vật. Đầu tiên động vật thường được tiêm vacxin, sau đó chúng có thể được tiêm chính vi sinh vật gây bệnh để kích thích sản xuất kháng thể mạnh mẽ hơn. Khi hiệu giá kháng thể trong huyết thanh đạt mức cao nhất, thì lấy máu để lấy huyết thanh đem bào chế. Động vật thường được dùng trong sản xuất huyết thanh là ngựa. Ngày nay, việc sử dụng huyết thanh động vật giảm đi nhiều vì tỷ lệ gây ra phản ứng cao hơn hẳn so với kháng thể được sản xuất từ huyết thanh người.

##### **\* Bào chế từ huyết thanh người:**

**Globulin miễn dịch bình thường:** Globulin miễn dịch bình thường được bào chế từ huyết thanh người khoẻ mạnh hoặc từ máu rau thai. Trước đây

globulin miễn dịch loại này còn được gọi là gamaglobulin. Ngày nay ở một số nước còn có tên là globulin huyết thanh miễn dịch (Immune Serum Globulin).

Loại globulin miễn dịch này mỗi lần (mẻ) được bào chế từ hàng nghìn mẫu huyết thanh, do đó không có sự khác nhau đáng kể về hiệu giá kháng thể giữa các lần sản xuất. Kháng thể trong globulin miễn dịch bình thường chủ yếu thuộc lớp IgG.

**Globulin miễn dịch đặc hiệu:** Globulin miễn dịch đặc hiệu được bào chế từ máu của những người mắc bệnh nhiễm trùng nào đó đã khỏi bệnh và hồi phục sức khỏe, hoặc từ máu của những người khỏe mạnh mới được tiêm chủng tăng cường. Trong globulin miễn dịch đặc hiệu, nồng độ kháng thể chống lại vi sinh vật, là căn nguyên của bệnh nhiễm trùng mà người cho đã mắc hoặc đã được tiêm chủng, thường cao gấp hàng chục lần trong globulin miễn dịch bình thường.

**Nguyên tắc sử dụng:**

Các nguyên tắc cơ bản phải thực hiện khi sử dụng huyết thanh là:

- Đúng đối tượng
- Đúng liều lượng
- Đúng đường
- Đề phòng phản ứng
- Phối hợp sử dụng vacxin

**Đối tượng:**

Huyết thanh được sử dụng nhiều nhất để chữa và dự phòng các bệnh nhiễm trùng. Ngoài ra nó còn được sử dụng cho một số mục đích khác như điều trị cho những bệnh nhân bị thiếu hụt miễn dịch, dị ứng và dự phòng bệnh tan máu sơ sinh.

Trong chữa và dự phòng bệnh nhiễm trùng, huyết thanh chỉ có hiệu lực với những bệnh mà cơ chế bảo vệ chủ yếu nhờ miễn dịch dịch thể. Kinh điển nhất là huyết thanh chống uốn ván (SAT) và huyết thanh chống bạch hầu (SAD). Huyết thanh chống ho gà, chống sởi được tiêm cho trẻ chưa được tiêm chủng khi có tiếp xúc với bệnh nhân. Huyết thanh chống dại được tiêm cho những người bị chó dại hoặc chó nghi dại cắn với vết thương nặng hoặc gần đầu. Ngoài ra còn có các huyết thanh chống virus viêm gan, virus quai bị, rubeon. Globulin miễn dịch còn được tiêm cho những bệnh nhân viêm đường hô hấp tái phát nhiều lần.

Huyết thanh người bình thường được tiêm cho trẻ bị thiếu hụt miễn dịch bẩm sinh. Một số công trình nghiên cứu cho thấy rằng globulin miễn dịch có tác dụng điều trị dị ứng.

Việc sử dụng globulin miễn dịch kháng D (Anti-D immune globulin) cho người mẹ có nhóm máu Rh(-) mới sinh con Rh(+) có tác dụng ngăn cản sự hình thành kháng thể kháng Rh và do đó tránh được nguy cơ tan máu sơ sinh cho đứa trẻ sinh lần sau. Cơ chế của hiện tượng này là globulin miễn dịch kháng D sẽ phá huỷ các hồng cầu Rh(+) của đứa trẻ xâm nhập vào dòng tuần hoàn của người mẹ khi sinh. Do cơ chế này, việc tiêm globulin kháng D chỉ có hiệu quả trong khoảng thời gian 72 giờ đầu sau khi sinh.

**Liều lượng:**



Liều lượng huyết thanh sử dụng tùy thuộc vào tuổi và cân nặng của bệnh nhân, trung bình từ 0,1 đến 1 ml cho 1kg cân nặng, tùy theo loại huyết thanh và mục đích sử dụng. Huyết thanh chống uốn ván được tính theo đơn vị, trung bình là 250 đơn vị cho một trường hợp. Nếu vết thương quá bẩn hoặc tiêm chậm sau 24 giờ thì liều lượng phải tăng gấp đôi.

### 3.3. Đường đưa huyết thanh vào cơ thể:

Huyết thanh thường được đưa vào cơ thể bằng đường tiêm bắp. Đối với những loại huyết thanh đã được tinh chế đạt tiêu chuẩn cao, có thể tiêm tĩnh mạch nhưng cũng rất nên hạn chế. Tuyệt đối không tiêm tĩnh mạch những huyết thanh có nguồn gốc từ động vật (dù đã được tinh chế!) hoặc huyết thanh người chưa đạt độ tinh chế cao.

#### **Đề phòng phản ứng:**

Cần phải thực hiện tốt các việc sau đây để ngăn ngừa phản ứng do huyết thanh gây ra:

- Hỏi xem bệnh nhân đã được tiêm huyết thanh lần nào chưa. Rất thận trọng khi phải chỉ định tiêm huyết thanh lần thứ hai vì tỷ lệ phản ứng cao hơn nhiều so với lần thứ nhất. Việc quyết định có tiêm huyết thanh lần thứ hai hay không tùy thuộc vào sự cân nhắc giữa nguy cơ mắc bệnh, tính nguy hiểm của bệnh và tỷ lệ phản ứng của loại huyết thanh được sử dụng.

- Làm phản ứng thoát mẫn (phản ứng Besredka ) trước khi tiêm: Pha loãng huyết thanh 10 lần bằng dung dịch NaCl 0,85%. Tiêm 0,1 ml vào trong da. Sau 30 phút nếu nơi tiêm không mẫn đỏ thì có thể tiêm huyết thanh. Nếu nơi tiêm mẫn đỏ, nói chung không nên tiêm, trừ khi tình trạng nhiễm trùng nhiễm độc của bệnh nhân đòi hỏi bắt buộc phải tiêm. Trong trường hợp đó cần chia nhỏ tổng liều để tiêm dần, cách nhau 20 đến 30 phút.

- Trong quá trình tiêm truyền huyết thanh phải theo dõi liên tục để có thể xử trí kịp thời nếu có phản ứng xảy ra, đặc biệt là phải đầy đủ các điều kiện để xử trí sốc phản vệ.

#### **Tiêm vaccin phối hợp:**

Kháng thể do tiêm huyết thanh sẽ phát huy hiệu lực ngay sau khi tiêm, nhưng chỉ tồn tại một thời gian ngắn. Hiệu giá kháng thể này giảm nhanh trong mấy ngày đầu, sau đó giảm chậm hơn và sẽ bị loại trừ hết sau khoảng 10 đến 15 ngày. Hai lý do của sự giảm nhanh chóng này là: kháng thể được đưa vào cơ thể sẽ phản ứng với các kháng nguyên vi sinh vật và bị cơ thể chuyển hoá giống như số phận của các protein ngoại lai khác. Việc tiêm vaccin phối hợp nhằm kích thích cơ thể tạo ra miễn dịch chủ động thay thế cho miễn dịch thụ động do tiêm huyết thanh hết hiệu lực.

#### **1.7. Kháng thể đơn dòng:**

Mỗi quyết định kháng nguyên sẽ kích thích tạo thành một kháng thể đặc hiệu. Khi một kháng nguyên có nhiều quyết định kháng nguyên (đa giá) sẽ cho một phức hợp kháng thể. Muốn nhận được một kháng thể trong phức hợp ấy thì phải tiến hành tách tinh khiết. Tuy nhiên ngày nay người ta có thể nhận được kháng thể tinh khiết

bằng kỹ thuật kháng thể đơn dòng. Kháng thể đơn dòng là kháng thể do một dòng lympho bào sinh ra để chống lại một kháng nguyên nhất định.

Sản xuất kháng thể đơn dòng: Năm 1975, Kohler và Milstein tiến hành lai tế bào u tủy ( myeloma) với tế bào T đã hoạt hóa ( bằng phương pháp dung hợp). ưu điểm của tế bào u tủy là có khả năng phân chia rất nhanh trong môi trường nhân tạo. Sau đó tách riêng từng tế bào lai nuôi trong môi trường nhân tạo để chúng phân chia tạo dòng tế bào sinh kháng thể. Kháng thể này gọi là kháng thể đơn dòng, có khả năng chống lại một quyết định kháng nguyên nhất định.

Kháng thể đơn dòng được áp dụng rất rộng rãi và thay thế một số phương pháp miễn dịch và huyết thanh học thông thường trong nhiều lĩnh vực như:

- Phát hiện một kháng nguyên chưa biết trên bề mặt tế bào.
- Xác định một số protein có ý nghĩa trong chẩn đoán ung thư.
- Xác định vi sinh vật.
- Ức chế phản ứng thải loại khi ghép cơ quan. Xác định các loại thuốc cấm sử dụng có trong máu ví dụ doping.v.v..

## **2. CÁC PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VẮC-XIN:**

### **2.1. Sản xuất vắc-xin theo phương pháp truyền thống (vắc-xin thể hệ thứ nhất):**

#### **2.1.1. Nguyên tắc chung:**

- **Tạo sinh khối:** Đây là giai đoạn đầu tiên để sản xuất vắc-xin. Vi sinh vật được nuôi cấy trong môi trường thích hợp để đạt được một số lượng lớn sinh khối hoặc sản phẩm của chúng (toxoid, antigen). Các chủng vi sinh vật trước khi nuôi cấy cần phải được kiểm tra về độ tinh khiết, không được lẫn vi sinh vật lạ. Quá trình nuôi cấy được thực hiện trong các nồi nuôi cấy đặc biệt, có các thiết bị kiểm soát đến quá trình tăng trưởng của vi sinh vật.

- **Làm bất hoạt:** Yêu cầu khi sản xuất vắc-xin là phải an toàn cho người sử dụng. Do đó các vi khuẩn sử dụng để chế tạo vắc-xin phải không còn khả năng gây bệnh nhưng vẫn giữ được tính kháng nguyên, nghĩa là có khả năng kích thích hệ thống miễn dịch của cơ thể.

**Đối với vắc-xin vi khuẩn chết:** có thể dùng các tác nhân diệt khuẩn như các hóa chất (formalin, alcohol, aceton), tia cực tím, siêu âm...

**Đối với vắc-xin từ vi khuẩn sống giảm độc:** có thể dùng phương pháp cấy chuyển vi khuẩn nhiều lần trong môi trường nuôi cấy. Ví dụ vắc-xin BCG (Bacille Calmette Guerin) là vắc-xin được chế tạo từ vi khuẩn lao bò được cấy chuyển trong thời gian dài trên môi trường nuôi cấy.

#### **- Sản xuất ra chế phẩm:**

Sau khi làm bất hoạt, tiếp tục tinh khiết hóa và đông khô để tạo sản phẩm, cuối cùng đóng gói. Tùy theo từng loại chế phẩm có thể đóng gói dưới dạng thuốc lỏng để uống, dạng thuốc viên, dạng thuốc tiêm.

#### **- Kiểm tra sản phẩm**

Cần phải kiểm tra: . Độ vô trùng: chế phẩm vắc-xin không được lẫn các vi sinh vật lạ

- . Đảm bảo đủ nồng độ.
- . Kiểm tra khả năng gây miễn dịch

## 2.1.2. Các vaccin cổ điển đã được sản xuất:

### 2.1.2.1. Vaccin vi khuẩn thương hàn:

**Nhân giống:** Nuôi vi khuẩn thương hàn trên môi trường thạch trong 18 h sau đó dùng NaCl đẳng trương để lấy vi khuẩn và điều chỉnh để đạt độ đậm đặc  $5.10^8$  vi khuẩn/1ml. Cấy vi khuẩn này vào môi trường mới sao cho thể tích ban đầu vi khuẩn chiếm 5% thể tích môi trường

**Nuôi cấy:** Môi trường lỏng casein chưa 300-400 mg N toàn phần, 200-250mg% N amin, 0,1-0,6% pepton. Cấy chìm trong môi trường nuôi cấy liên tục có hệ thống khuấy vận tốc 180-300v/ phút để tăng oxy cho hệ thống, hệ thống lọc khí vô trùng với lưu lượng 1lit/1phút. Nuôi trong 10-12 giờ để đạt được nồng độ khoảng  $6.10^{10}$  vi khuẩn

. Để tăng khả năng sinh sản của vi khuẩn thêm dung dịch glucoza 40%, giữ pH= 7,6-7,8 trong suốt thời gian nuôi cấy .

**Làm bất hoạt:** Vaccin được làm bất hoạt bằng cồn: Lấy sinh khối trộn thận trọng trong bình đặc biệt với cồn ethyl theo tỉ lệ lần 1:1:4, lần 2 1:10

**Kiểm tra độ tinh khiết và đáp ứng miễn dịch** rồi đưa dung dịch về điểm đẳng điện bằng NaCl có chứa 0,25% phenol sẽ tạo tủa. 1ml vaccin còn chứa  $5.10^9$  vi khuẩn. Đổ vaccin vào ống và đông khô  $-40^0C$  -  $50^0C$  rồi đông gói thành phẩm. Vaccin này có thể nhập chung với VI antigen để tăng hiệu quả.

4Vắc-xin **tái tổ hợp**: với **công nghệ gen** hiện đại, người ta cắt đoạn gen tổng hợp nên protein đặc trưng cho vi sinh vật gây bệnh, ghép gen này vào vi khuẩn hay **tế bào nuôi cấy** để tạo ra protein đặc hiệu cho mầm bệnh, dùng protein này để tiêm chủng tạo miễn dịch đặc hiệu. Dạng vắc-xin này an toàn, ít tác dụng phụ, khả năng miễn dịch cao. Một điển hình của vắc-xin dạng này là vắc-xin phòng viêm gan virus B **thế hệ II** và III.

- Các "**toxoid**" là các hợp chất độc bị bất hoạt trích từ các vi sinh vật (trong trường hợp chính các độc chất này là phương tiện gây bệnh của vi sinh vật). Chúng được tiêm cho vật chủ khác (như **ngựa**) để tạo kháng thể, rồi chiết lấy kháng thể này để chữa bệnh. Thí dụ: các **huyết thanh** ngựa **uốn ván** và **bạch hầu**.

### Một số loại vắc-xin mới đang nghiên cứu

Các vắc-xin này còn được xem là vắc-xin của tương lai, có 6 hướng phát triển chính hiện nay:

- Sử dụng các **phụ gia** (*adjuvant*) mới, nhằm gây ra loại đáp ứng miễn dịch mong muốn. Thí dụ, chất nhôm phosphate và các oligonucleotide chứa CpG demethyl hóa đưa vào vắc-xin khiến đáp ứng miễn dịch phát triển theo hướng **dịch thể** (tạo **kháng thể**) thay vì **tế bào**.
- **Vắc-xin khảm**: sử dụng một sinh thể quen biết để hạn chế hiện tượng "phản tác dụng", thí dụ dùng virus vaccinia mang một số yếu tố của virus **viêm gan B** hay virus **dại**.
- **Vắc-xin polypeptidique**: tăng cường tính sinh miễn dịch nhờ liên kết tốt hơn với các phân tử **MHC**: peptide nhân tạo 1/2 giống virus, 1/2 kia gắn MHC; đoạn peptide mô phỏng 1 **quyết định kháng nguyên** (*epitope*).
- **Anti-idiotypic**: **idiotypic** là cấu trúc không gian của kháng thể tại vị trí gắn kháng nguyên, đặc hiệu với kháng nguyên tương ứng. Anti-idiotypic là các kháng thể đặc hiệu đối với idiotypic, do đó anti-idiotypic xét về mặt đặc hiệu lại tương tự với kháng nguyên. Vậy, thay vì dùng kháng nguyên X làm vắc-xin, người ta dùng idiotypic anti-anti-X.
- Vắc-xin **DNA**: DNA của tác nhân gây bệnh sẽ được biểu hiện bởi tế bào người được chủng ngừa. Lợi thế của DNA là rẻ, bền, dễ sản xuất ra số lượng lớn nên thích hợp cho những chương trình tiêm chủng rộng rãi. Ngoài ra, vắc-xin DNA còn giúp định hướng đáp ứng miễn dịch: tác nhân gây bệnh ngoại bào được trình diện qua **MHC** loại II, dẫn đến đáp ứng CD4 (**đáp ứng miễn dịch dịch thể**). Khi kháng nguyên của tác nhân đó được chính cơ thể người biểu hiện, nó sẽ được trình diện qua MHC loại I, lúc này **đáp ứng miễn dịch tế bào** qua CD8 được kích thích. Tuy nhiên phương pháp này là con dao hai lưỡi bởi lẽ tế bào mang DNA lạ có nguy cơ bị nhận diện là "không ta", sinh ra bệnh tự miễn.
- Sử dụng **véc-tơ** tái tổ hợp – dùng các vi khuẩn thuần tính hoặc các **tế bào trình diện kháng nguyên** như **tế bào tua** được chuyển gen để biểu hiện kháng nguyên mong muốn.

### Vắc-xin dùng để điều trị

Một trong những hướng nghiên cứu mới là **miễn dịch liệu pháp**, bao gồm miễn dịch liệu pháp thụ động và chủ động (tức **vắc-xin liệu pháp**). Người ta hy vọng là phương pháp này sẽ chữa được những bệnh như **ung thư**, **AIDS** và **bệnh Alzheimer**.

### Hạn chế của vắc-xin

Những hạn chế của vắc-xin tập trung thành hai nhóm chính: hiệu quả kém và các tai biến đi kèm.

### Hạn chế về hiệu quả

Một số vắc-xin rất có hiệu quả, không kể vắc-xin đậu mùa nổi tiếng, thí dụ vắc-xin ngừa bệnh uốn ván, sởi v.v. Một số vắc-xin khác có hiệu quả vừa phải (hiệu quả của BCG chỉ vào khoảng 50%). Ngược lại, có những bệnh đến đầu thế kỷ 21 vẫn chưa có vắc-xin thích hợp (AIDS, sốt rét v.v.). Do vậy, vắc-xin chưa phải là vũ khí vạn năng để đối phó với bệnh tật.

Hiệu quả của vắc-xin cũng khó đánh giá chính xác. Kết quả nghiên cứu trên động vật không thể áp dụng 100% cho loài người, vì những đặc điểm riêng của từng loài. Trên lý thuyết, phương pháp duy nhất để chứng minh hiệu quả là lấy 2 nhóm người, một nhóm được tiêm chủng, một nhóm không rồi truyền mầm bệnh cho cả hai nhóm để xem kết quả. Dĩ nhiên phương pháp này không thể sử dụng được vì trái đạo đức. Do đó, người ta biến hóa đi một chút, cũng chia ra 2 nhóm được chủng và không được chủng như trên nhưng không truyền bệnh mà chỉ quan sát sự nhiễm bệnh qua các ngã thông thường. Hạn chế của phương pháp này là nếu một vắc-xin tỏ ra có hiệu quả, người ta không thể triển khai nghiên cứu trên quy mô rộng để tính chính xác hiệu quả vì như thế một số lớn quần chúng sẽ bị thiệt thòi do không được bảo vệ.

Bởi vậy, khi một vắc-xin được xem là có hiệu quả, người ta đem tiêm chủng cho mọi người và quan sát sự giảm số người mắc bệnh. Tuy nhiên, ngay cả khi một bệnh có chiều hướng giảm xuống, người ta cũng không biết vai trò thật sự của vắc-xin, thí dụ tần suất bệnh lao đã giảm rất nhiều, nhưng vai trò của các biện pháp vệ sinh, cách ly nguồn lây cũng rất đáng kể. Tính kém hiệu quả của vắc-xin có thể biểu hiện về mặt chất (đáp ứng miễn dịch không thích hợp) hoặc về mặt lượng (không có đáp ứng miễn dịch).

**Nguyên nhân gây kém hiệu quả về lượng:**

- *Các "lỗ hổng" trong kho tàng miễn dịch:* trên lý thuyết, các tế bào lympho B có thể tạo ra hơn  $10^{12}$  loại kháng thể đặc hiệu [1], còn lympho T có thể nhận diện trên  $10^{15}$  kháng nguyên khác nhau [], những con số này tuy rất lớn nhưng không phải là vô hạn, hệ miễn dịch không thể chống lại mọi thứ.
- **Hiệu quả của vắc-xin còn tùy thuộc vào *thời gian bảo vệ*:** trí nhớ miễn dịch có thể tồn tại suốt đời nhưng sự sản xuất kháng thể thì không nếu không được tái kích thích.
- **Đột biến của tác nhân gây bệnh:** đây là cơ chế sinh tồn của các tác nhân gây bệnh. Đột biến đẩy hệ miễn dịch vào một cuộc rượt đuổi trường kỳ. Tiêu biểu cho cơ chế này là HIV, virus sốt xuất huyết, virus cúm với nguy cơ đại dịch cúm gia cầm hiện nay.

**Nguyên nhân gây kém hiệu quả về chất:**

- *Vai trò của phụ gia*: để giảm tác dụng không mong muốn của vắc-xin, người ta thường tinh lọc các chế phẩm, nhưng có những vắc-xin quá tinh khiết lại trở nên kém hiệu quả. Đó là do hệ miễn dịch muốn được kích hoạt, phải nhận được một tín hiệu báo nguy, tín hiệu này thường không phải là **kháng nguyên** dùng làm vắc-xin. Để khắc phục, người ta dùng một số loại phụ gia trong chế phẩm vắc-xin. Thí dụ **phụ gia Freund**, nhôm hydrôxít, nhôm phosphate hoặc trộn lẫn các vắc-xin với nhau.
- *Loại phản ứng miễn dịch và hiện tượng chuyển hướng miễn dịch*: đối với các tác nhân gây bệnh ngoại bào, đáp ứng miễn dịch dịch thể là thích hợp (loại đáp ứng này được sự hỗ trợ của các tế bào **lympho Th1**). Ngược lại, đáp ứng miễn dịch tế bào (cần sự hỗ trợ của **lympho Th2**) lại hữu hiệu cho các tác nhân gây bệnh nội bào. Do đó, nếu vắc-xin gây được đáp ứng miễn dịch nhưng không đúng loại đáp ứng nên có, hiệu quả cũng không được bảo đảm. Th1 và Th2 có xu hướng khác chế lẫn nhau. Vắc-xin kinh điển có xu hướng tạo đáp ứng Th1. Do đó đối với những bệnh do tác nhân nội bào như nhiễm **leishmania**, miễn dịch đặc hiệu sau lành bệnh lại tốt hơn vắc-xin, vì vắc-xin lại gây hiệu quả ngược, kiềm hãm phản ứng bảo vệ.

### Tai biến khi dùng vắc-xin

Có hai loại tai biến: nhiễm bệnh và các bệnh miễn dịch. Nhiễm bệnh

- **Vắc-xin sống, giảm độc lực** có thể gây bệnh cho người bị suy giảm miễn dịch.
- Nguy cơ hồi phục của tác nhân vi sinh: một tác nhân bị làm giảm độc lực tìm lại được độc tính của mình. Nguy cơ này ở vắc-xin ngừa **bại liệt** là  $10^{-7}$ , nghĩa là cứ 10 triệu trẻ em uống **vắc-xin Sabin** thì có 1 em bị tai nạn loại này. Điều không may này không ngăn cản được việc sử dụng vắc-xin này bởi lẽ tỷ lệ đó được xem là chấp nhận được.
- Nguy cơ nhiễm các tác nhân gây bệnh khác vào trong chế phẩm vắc-xin. Điều này có thể hạn chế bằng các quy trình sản xuất, bảo quản và sử dụng chặt chẽ.

### Bệnh miễn dịch

- Thử nghiệm vắc-xin phòng **bệnh dại** trên **cừu** cho thấy có xác suất gây **EAE**, một bệnh tự miễn trên hệ thần kinh khoảng 1/3000-1/1000. Lý do có thể là vắc-xin chiết xuất từ não chó đã mang theo cả những mẫu protein của tế bào thần kinh, khi tạo miễn dịch, cơ thể (được tiêm) đã tạo ra cả kháng thể chống lại cấu trúc thần kinh của mình.

- Vắc-xin ngừa **ho gà** có thể gây **sốc** kèm **di chứng** thần kinh với xác suất  $10^{-4}$ - $10^{-6}$ . Việc tinh lọc vắc-xin này làm tăng mức an toàn nhưng một lần nữa, giảm hiệu quả.

## Chủng ngừa

Chủng ngừa là cho vắc-xin tiếp xúc với hệ miễn dịch. Tùy bản chất ký sinh, bệnh sinh của tác nhân gây bệnh cũng như của chế phẩm vắc-xin mà người ta dùng các phương pháp khác nhau nhằm đạt hiệu quả cao nhất.

- Chủng là cách tạo một vết rạch trên da (cho rớm máu) rồi cho tiếp xúc với vắc-xin. Phương pháp này trước đây được dùng cho vắc-xin **đậu mùa** và **lao**.
- **Tiêm** dưới da, trong da v.v. là phương pháp phổ thông nhất hiện nay, kể cả vắc-xin BCG phòng lao. Không được tiêm vào mạch máu.
- Uống vắc-xin là phương pháp dùng cho vắc-xin Sabin ngừa **bệnh bại liệt**.

## Đánh giá hiệu quả và theo dõi

Trong một số trường hợp, thí dụ sau khi tiêm vắc-xin ngừa **viêm gan siêu vi B**, người ta còn làm xét nghiệm huyết thanh tìm **hiệu giá kháng thể** qua đó đánh giá hiệu quả của vắc-xin trên cơ thể người được tiêm (có tạo được đáp ứng miễn dịch hữu hiệu không).

**Tổ chức Sức khỏe Thế giới** (WHO) đã hỗ trợ nhiều **chương trình tiêm chủng mở rộng** trên phạm vi toàn cầu trong kế hoạch **chăm sóc sức khỏe ban đầu**.

Đẩy mạnh nghiên cứu nhằm tìm ra các vắc-xin mới, hiệu quả với giá thành phù hợp cho mục tiêu phổ cập cho mọi người, nhất là đối với những bệnh gây chết người nhiều như **sốt rét** hay những bệnh nan y như **ung thư**, **AIDS** cũng là mục tiêu của y sinh học hiện nay.

## Phản đối

Tuy góp phần quan trọng đẩy lui nhiều bệnh dịch, chủng ngừa vẫn bị nhiều ý kiến phản đối, kể từ những chiến dịch tiêm chủng đầu tiên trong lịch sử: [2]. Các ý kiến đó chủ yếu dựa trên các tác dụng không mong muốn của vắc-xin. Trong phần **Liên kết ngoài** có một số địa chỉ thuộc nhóm này.