لقاح الدفتيريا, تحضير, تقييم و مقارنة

إعداد
فاطمة محمد بن محمد الأمين الشنقيطي
بكالوريوس علوم ـ أحياء دقيقة

بحث مقدم للحصول على درجة الماجستير في العلوم
تخصص الأحياء الدقيقة

إشراف
أ.د الراشدي مصطفى رضوان
أستاذ كلية العلوم قسم الأحياء

أستاذ مشارك كلية العلوم قسم الأحياء

كلية العلوم
جامعة الملك عبد العزيز
جدة - المملكة العربية السعودية
١٤٣٨هـ /٢٠١٧ م

الملخص العربي

حاليا ومع زيادة وتوسع النمو الاقتصادي في المجتمع السكاني, وبالتالي زيادة الأنشطة الخارجية في المملكة العربية السعودية والمنطقة العربية ازدادت اهمية وخطورة لقاحي الدفتيريا والتيتانوس. لكن للأسف الى يومنا هذا لا يوجد لقاحات يتم تصنيعها في العالم العربي ,حيث ان جميع اللقاحات يتم استيرادها دوليا. الهدف الرئيسي لهذا البحث هو بناء قاعدة علمية لهذا العلم من خلال إيجاد كوادر مدربة على ذلك. وكذلك تحضير لقاح الدفتيريا محليا في المعامل ومقارنته باللقاح المصنع خارجيا والمستورد من شركة سانوفي باستير الفرنسية والمصرح من وزارة الصحة السعودية. يتم تقييم اللقاحات المحضرة معمليا والمستوردة من حيث التركيب والوصف الداخلي والشكل الجزيئ, وكذلك يتم تقييم فاعليتها وسميتها داخل الجسم وقدرتها علي تحفيز الجهاز المناعي وتكوين استجابة مناعية وذلك من خلال حقن حيوانات التجارب وتم اختبار امصالها بعد فترات محددة. تحضير اللقاح يتم في عدة خطوات: أولا يتم تحضير المواد المحفزة والمساعدة والتي تعمل كحامل لبروتين اللقاح, يتم في هذه الخطوة تحضير ثلاث تحضيرات مختلفة للمواد المحفزة وهي فوسفات الكالسيوم, هيدروكسيد الألمنيوم, فوسفات الألمنيوم. بعدها يتم معالجة التحضيرات المعملية بتعريضها لنوعين من الموجات, الموجات فوق الصوتية والموجات الصغرية (الميكروويف) وذلك باستخدام جهاز التكسير الخاص وجهاز الميكروويف والهدف من ذلك هو تقليل حجمها وتصغير جزيئاتها. بعد ذلك يتم تحميل بروتين اللقاح (التوكسويد) على المواد المساعدة المحضرة معمليا. في الخطوة الثانية يتم حقن فئران التجارب من سلالة BALB/c, تم حقنها باللقاح المحضر محليا في المعمل, كذلك اللقاح المصنع دوليا. في الخطوة الثالثة يأتي الهدف الثاني لهذه الدراسة والذي يتمثل في التقييم, تم تقييم اللقاح المحضر ومقارنتها باللقاحات الاخرى المستوردة كل على حدة. تم تقييم مدى الاستجابة المناعية الناتجة ونوعيتها, وقوتها ومن ثم تأثير المواد الكيميائية التي حضرت منها في تحفيز الجهاز المناعي على الاستجابة للقاح. تم قياس المحددات والمعالم المناعية في امصال حيوانات التجارب عن طريق مجموعة مواد خاصة لاختبار الإليزا. المعالم المناعية المهمة التي تم قياسها تتمثل في الأجسام المضادة وتركيزها في المصل, قياس أنواع الأجسام المضادة وقياس السيتوكينات في المصل خلال ايام التجربة. بعد ذلك تم عمل التقييم والمقارنات بين مجموعات التجربة. أظهرت نتائج الدراسة التي حصلنا عليها أن المواد المحفزة المساعدة التي تم تصغير جزيئاتها بالموجات فوق الصوتية كان لها تأثير واضح في الاستجابة المناعية الملاحظة على فئران التجارب حيث كانت نسبة تحميل التوكسويد على هذه المواد أكبر من الأخرى التي لم يتم معالجتها. حيث كانت نسبة الاجسام المضادة التي تم

قياسها في مصل الفئران التي تم حقنها باللقاحات المحتوية على مواد مساعدة مصغرة الحجم مرتفعة عن تلك التي لم يتم تصغير جزيئاتها. كذلك السيتوكينات التي تم قياسها أظهرت النتائج أن جميع المواد المحفزة المساعدة التي تم تحضيرها تميل الى تحفيز انتاج انواع معينة من السيتوكينات وهي تلك المحفز انتاجها بواسطة الخلايا اللمفية التائية المساعدة (TH2) تظهر في تحضيرات املاح الألمنيوم بينما فوسفات الكالسيوم تميل الى تحفيز الاثنين معا TH1,TH. نستنتج من خلال هذه القراءات للنتائج أن المواد المحفزة المساعدة لها دور ملاحظ ومهم في تحسين اللقاح وتطويره خاصة اذا تم معاملة هذا اللقاح بتصغير المواد المساعدة فيزيائيا وتصغير أحجامها, فإنها تكون ذا دور أكبر في حدوث استجابة مناعية مؤثرة ضد المستضد, وبالتالي تنشيط الجهاز المناعي.

Subunit Diphtheria Vaccine Preparation, Evaluation and Comparison.

By
Fatimah Mohammed M.A. Alshanqiti

A Thesis Submitted for the Requirements of The Master Degree In Microbiology

Supervised by

Prof. Dr. Elrashdy Mustafa Redwan

Dr. Saad Berki Almasaudi

Faculty of Science
King Abdul Aziz University
Jeddah – Kingdom of Saudi Arabia
Shaaban 1438 Hijri – May 2017

Abstract

It's known that diphtheria was a contagious lethal disease over the years, infects upper respiratory system. Disease result from the production of diphtheria toxin by the pathogenic microbe *corynebacterium diphtheria* in conjunction with infection by a bacteriophage which provides it with the toxin-producing gene. Vaccination with diphtheria toxoid vaccine is the best way to prevent this epidemic disease from spread. Nano-particles carrier and/or adjuvants can be engineered to enhance the immune responses. As well known the immune response to inactivate killed and subunit vaccines enhanced by alum adjuvants. Adjuvant has examined and tested after reducing its volume to particle size, thus mimic size of viruses which is considered smallest units can effect on the immune system, The major aim of our study is minimizing the adjuvant particles, to gain insight of resulting immunity titer, types and impact on immune response antibody subtypes. The adjuvant effect of micro/nano-particles appears to largely be a consequence of their uptake into APC. More importantly, particulate vaccines have been shown to be more efficient than soluble one for the induction of the immune responses. The result shows higher percentage of protein loaded on particulate adjuvant more than the standard adjuvant without treatment. It shows a significant increasing in immunological parameter; antibodies titer increased in mice serum that injected with vaccine contains particulate adjuvant more than the once in mice injected with vaccine contains standard adjuvant and commercial vaccine. The result shows that the adjuvants tends to induce TH2 cytokines in alum compounds adjuvant and TH1 cytokines profile in response to calcium phosphate adjuvant, which both of them depends on antibodies isotype. In conclusion, different adjuvants preparation affect on immune response as

it gets on commercial vaccine. Different treatments to adjuvant preparation for particulate molecules have a considerable impact on vaccine immunogenicity.