دراسة كفاءة اعطاء ذيفان الجمرة الخبيثة كلقاح عن طريق الأنف ومقارنته مع طريقة الحقن تحت الجلد

ابراهيم عبد الحسين الزبيدي
وحدة الأمراض المشتركة – كلية الطب البيطري– جامعة بغداد – العراق

الخلاصة

جرى في هذه الدراسة تحضير ذيفان جرثومة الـ *Bacillus anthracis* واستخدامه كلقاح لتمنيع مجموعتين من خنازير غينيا. اذ منعت المجموعة الأولى بجرعة 0.5 مل تحت الجلد بينما منعت المجموعة الثانية بتقطير 8 قطرات داخل الأنف (4 في كل منخر) . أعطيت حيوانات المجموعتين جرعة ثانية من اللقاح كتقوية بعد 14 يوما من الجرعة الأولى. سحب الدم من القلب من الحيوانات الممنعة وحيوانات السيطرة بعد 20 يوما من جرعة التقوية.

جرى في الدراسة الحالية استخدام مادة الأنثراكسين كمستضد في اختبار الأليزا (ELISA) لقياس شدة الكثافة الضوئية الناتجة من اعطاء اللقاح بطريقتين مختلفة ، وقد سجلت مجموعة الحقن تحت الجلد أعلى معدل للكثافة الضوئية بلغ 0.07 ± 1.660 نانوميتر في حين سجلت مجموعة التقطير داخل الأنف معدل 0.002 ± 1.181 نانوميتر.

Studying the efficacy of giving anthrax toxin as a vaccine intranasally and subcutaneously

Al-Zubaidy, I.A.H.
Zoonotic Diseases Unit- College of Vet. Med. -Baghdad University- Iraq

Summary

This study was concerned on the production of *Bacillus anthracis* toxin and its use as a vaccine. Two groups of guinea pigs were immunized with the toxin which was given in a dose of 0.5 ml subcutaneously to the 1st group while the animals of the 2nd group were immunized by instillation in the nose 4 drops into each naris. The two groups were given booster dose 14 days after the 1st dose. The immunized and control animals were bled by cardiac puncture 20 days after the booster dose.

In the present study, anthraxin was used as an antigen in Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay (ELISA) to measure the optical density

(OD) obtained from adminsteration of vaccine in two different routes. High mean of optical density 1.660 ± 0.07 nanometer was recorded to subcutaneous group and the mean 1.181 ± 0.002 nanometer to the intranasal group.

المقدمة

رغم الدراسات المستفيضة حول ذيفان الجمرة الخبيثة الأ أنها لا تزال متضاربة من ناحية أي من مكونات الذيفان يولد مناعة وافية لحماية الحيوانات ضد التحدي سواء بالجرثومة الضارية أو أبواغها أو بالذيفان. فهناك من الباحثين من يؤيد ضرورة وجود كافة عوامل الذيفان أمثال (1) الذين أوضحوا أن اللقاح المستخدم لتمنيع البشر والحيوانات على حد سواء يجب أن يحوي كل مكونات الذيفان للحصول على حماية فعّالة ومؤثرة. وأشار (2) الى أن اعطاء العوامل الثلاثة للذيفان(عامل الخزب EF والمستضد الحامي PA والعامل القاتل LF) جهازيا (Systemic) تعطي درجات مختلفة من الحماية ضد التحدي بالأبواغ أو الذيفان في الحيوانات التجريبية.

بين كل من (3 و4) أن المستويات العالية للأضداد الموجهة للمستضد الحامي غير كافية لتوليد حماية جيدة لا سيما في الحيوانات. وأضاف (5) الى أن المستضد الحامي لوحده غير كاف لتحفيز مناعة في البشر وأن اضافة مستضدات أخرى غير متخصصة ربما تكون ضرورية. فبالاضافة الى PA فأن LF و EF ممكن أن تلعب دورا مهما في توفير المناعة (6) وأن التمنيع بالاقتصار على المكونات الجسمية لجرثومة الجمرة الخبيثة مثل متعدد السكريدات السطحي والمستضدات البروتينية المرتبطة بالجدار (Extractable antigen 1 (EA1 و EA2 لا توفر مناعة وافية (7). وأن الدراسات التي أعتمدت على التمنيع بالأبواغ تقترح أن مستضدات أخرى من جرثومة *B. anthracis* يمكن أن تسهم بصورة مهمة في توفير المناعة الواقية (8). وللأسباب السابقة وغيرها جرى في هذه الدراسة استخدام الذيفان الخام للجمرة الخبيثة (والذي يحتوي على بعض المستضدات الجسمية) للتمنيع ضد المرض ولا سيما وأن لقاح الأبواغ الحية المحضر من عترة ستيرن والمستخدم للأغراض البيطرية يسبب العديد من التأثيرات الجانبية (9 و10) ويؤدي الى هلاك بعض الفصائل الحيوانية الحساسة بسبب مايحوية من ضراوة متبقية (11).

أن أبواغ الجرثومة ممكن أن تغزو المضيف من خلال الطبقات المخاطية (mucosal route) وتسبب الشكل التنفسي أو الاستنشاقي للجمرة الخبيثة (Inhalational Anthrax) وهو الشكل الأكثر خطورة ويؤدي الى الهلاك بعد استنشاق الأبواغ (12 و13). أن أفضل حماية ضد الشكل التنفسي والشكل المعدي المعوي للجمرة الخبيثة (Gastroenteritis form) تتطلب توفير مناعة جهازية و مناعة عند السطوح المخاطية (Mucosal Immunity) والمعروف أن

التمنيع داخل أدمة الجلد (I.d) أو الحقن بالعضلة (i.m) توفر مناعة جهازية ولكن ليس بامكانها تحفيز مناعة افرازية (secretory) عند السطوح المخاطية لأماكن دخول الأبواغ (14). نظرا لكون ذيفان الجمرة الخبيثة الذي يتحرر بعد تجرثم (Germination) الأبواغ يلعب دورا مهما في هذا المرض (15)، وأن درجة الحرارة المثلى لتحول الأبواغ الى الطور الخضري هي 22°م (16) والتي تتوفر في القناة التنفسية العليا، ولكون كل من الأخيرة والقناة المعدية المعوية تعد الأهداف الأولى للذيفان بعد استنشاق الأبواغ (17) لذا اتجهت الدراسات الحديثة نحو اعطاء لقاحات الجمرة الخبيثة عن طريق الأنف، ولا سيما وأن اللقاح البشري المصرّح به في الولايات المتحدة يتطلب حقن ستة جرع تحت الجلد خلال 18 شهرا (18)، أما اللقاح المستعمل في المملكة المتحدة فيستلزم أربعة جرع بالعضلة تعطى خلال ستة أشهر، وكلاهما يسببان تفاعلات موضعية وتتطلب جرع تقوية تعطى سنويا (19). فضلا عن كون برامج التمنيع تتطلب تكريس موارد طبية كبيرة خاصة في حالة تمنيع أعداد كبيرة (mass immunization) كما يحصل في حالات الرعب البايولوجي وهذا يجعل من الصعوبة الاذعان الى برامج التمنيع ويؤشر ضرورة تطوير طرق تمنيع بديلة ومثالية (20). أن اعطاء اللقاح داخل الأنف ربما يعد طريقة تمنيع فعّالة لتحسين برامج التمنيع ضد الجمرة الخبيثة (21)، اذ أن اعطاء جرعتين فقط من اللقاح بهذه الطريقة ولدت حماية كافية للفئران ضد التحدي بالأبواغ سواء المعطاة عن طريق الأنف أو بالأستنشاق (19) لذا جاءت هذه الدراسة لمعرفة كفاءة التمنيع بالذيفان عن طريق الأنف ومقارنته مع طريقة الحقن تحت الجلد وخاصة اننا لم نجد في المصادر العلمية ما يشير الى التمنيع بالذيفان الكامل الخام عن طريق الأنف وباستعمال خنازير غينيا واقتصرت البحوث الحديثة على تقييم هذه الطريقة في الفئران دون سواها.

المواد وطرائق العمل

- العترة الجرثومية: أستخدمت جرثومة *B.anthracis* عترة ستيرن (Sterne) 34F2 لأنتاج الذيفان والأنثراكسين. جرى الحصول عليها من شركة الكندي لأنتاج اللقاحات والأدوية البيطرية/ بغداد- أبي غريب.
- ذيفان الجمرة الخبيثة: جرى تحضيره باستخدام وسط أحماض الكازامينو (Casaminoacid medium) وفقا لطريقة (22). جرى تركيز الذيفان وذلك بوضعه في أنبوبة منفاذة (Dialysis tube) ذات قطر صغير في الثلاجة بدرجة 4°م.
- الأنثراكسين: حضر حسب طريقة (23) المحوّرة من قبل (24).

تصميم الدراسة

1-أجريت اختبارات الكشف عن الفعاليات البايولوجية للذيفان كالآتي:-

أ-اختبار الخزب: جرى بحقن 0.1 مل من الذيفان داخل أدمة جلد خنازير غينيا عدد 5. قرأ التفاعل الجلدي في منطقة الحقن بعد 24 و 48 ساعة من الحقن.

ب- الاختبار القاتل: حقن اثنان من الفئران بوزن (20-25) غم بجرعة 0.5 مل من الذيفان المركّز داخل الخلب (Intraperitonially)، وجرى مراقبتها لمدة أسبوع.

2- منعت 6 خنازير غينيا باللقاح (الذيفان) بجرعة 0.5 مل بالحقن تحت الجلد، ومنعت 6 خنازير غينيا أخرى بتقطير 8 قطرات من الذيفان داخل الأنف (4 قطرات في كل منخر).

مجموعة السيطرة وعددها 4 حيوانات فأعطيت اثنان منها محلول دارىء الفوسفات الملحي المعقم بالتقطير داخل الأنف وحقن الأثنان الآخران بالمحلول نفسه بجرعة 0.5 مل تحت الجلد.

3- بعد 14يوما أعطيت الحيوانات الممنعة جرعة تقوية بنفس طريقة اعطاء اللقاح بالمرة الأولى.

4- بعد 20 يوما من جرعة التقوية جرى نزف الدم من القلب من الحيوانات الممنعة والسيطرة للحصول على المصل.

5- جرى قياس شدة الكثافة الضوئية للمجموعتين الممنعتين فضلا عن مجموعة السيطرة باستخدام اختبار الاليزا بالطريقة غير المباشرة باستخدام عدة الفحص المجهّز من شركة (TECRA)، وأستخدم الأنثراكسين كأداة للفحص لأكساء طبق المعايرة الدقيق. قرأت النتائج بوساطة ELISA reader نوع (Hitachi) على الطول الموجي 450 نانوميتر، وأعتمدت قراءة شدة الكثافة الضوئية التي مقدارها (OD= 0.931) كقراءة فاصلة بين الموجب والسالب وحسب تعليمات الشركة المنتجة لعدّة الفحص (فالأقل من هذه القيمة عدّ نتيجة سالبة).

النتائج

1- نتائج تركيز الذيفان

جرى تركيز الذيفان الى سدس حجمه، اذ كان حجمه الأصلي 55 مل قبل تركيزه أصبح 9 مل بعد التركيز. استغرقت العملية ثمانون يوما بدرجة 4°م.

2- نتائج الاختبارات البايولوجية للذيفان

أ- اختبار الخزب

التفاعل الخزبي لذيفان عصيات الجمرة الخبيثة موضح في الجدول الآتي:-

جدول(1): نتائج الاختبار الجلدي للذيفان من حيث فرق تثخن الجلد وقطر منطقة الاحمرار

رقم الحيوان	فرق تثخن الجلد بالملم		قطرمنطقة الاحمرار بالملم	
	بعد 24 ساعة	بعد48 ساعة	بعد24 ساعة	بعد48 ساعة

0	*7	2	2	1
0	*11	2	2	2
0	*8	2	3	3
0	*14	1	1	4
0	0	2	4	5
0	8	1.8	2.4	المعدل الحسابي

* تعني احمرار باهت

ب- الاختبار القاتل : لم تهلك الفئران المحقونة بالذيفان المركز.

3- نتائج اختبار الاليزا

بينت النتائج أن أعلى معدل للكثافة الضوئية كان لمجموعة الحقن تحت الجلد اذ بلغ 0.07 ± 1.660نانوميتر(والذي يعكس المعدل العالي للمعيار الحجمي للأضداد) ، وبلغ معدل الكثافة البصرية 0.002 ± 1.181 نانوميتر لمجموعة التقطير داخل الأنف. في حين سجل معدل 0 ± 1.398 نانوميتر للسيطرة الموجبة و 0 ± 0.163 نانوميتر للسيطرة السالبة.

(تمثل هذه الأرقام الخطأ القياسي ± المعدل)

المناقشة

أوضحت الدراسة عدم هلاك الفئران المحقونة بالذيفان الكامل للجمرة الخبيثة ، اذ أوضح (25) أن الجرعة السامة (Toxic dose) المسببة للنفوق هي 15وحدة/ كغم من وزن جسم الجرذان و 1000 وحدة/كغم من وزن جسم الفئران و 2500 وحدة/ كغم للقردة. قد يعود السبب في عدم هلاك الفئران الى أن EF (عامل الخزب) يثبط الفعل المميت (Lethality) لل LF (العامل القاتل) (26) وهذا يتفق مع ما أشار اليه (1) من أن اضافة EF الى كل من PA و LF يؤدي الى تداخله مع LF وبالتالي يزيد من مقاومة الحيوانات للذيفان ولذلك استخدمنا كل مكونات الذيفان للتمنيع والذي جرى تركيزه الى السدس لمدة ثمانون يوما ليكون أكثر أمانا للحيوانات اذ أشار الهيتي (27) الى أن الذيفان يفقد فعّاليته المميتة بعد تركيزه بالتبخير المبرد (باستعمال أنبوبة منفاذة).

بما أن النفوق بالجمرة الخبيثة يعزى الى التأثير المباشر للذيفان القاتل Lethal Toxin(LT) (الذي ينتج من اتحاد PA+LF) الذي يعمل على تحلل البلاعم الكبيرة (macrophages) عند التعرض لتراكيز عالية منه (28) مؤديا الى تحرر المدورات الخلوية السامة من البلاعم الكبيرة مثل الانترلوكين 1 (Interleukin-1(IL-1 وعامل تنخر الورم

Tumour Necrosis Factor (TNF) (29). لكن هذا سوف لن يحصل عند حقن مستحضرات الذيفان الخام فهي تعمل على اعاقة عملية الجذب الكيميائي (chemotaxis) للعدلات وتثبط عملية البلعمة والقتل وبذلك تنجو البلاعم الكبيرة من التحلل بواسطة LT (30). أشارت (29) الى أنه في حالة الجرع الواطئة من LF أو LT تعمل المدورات الخلوية وخاصة IL-1 المنتجة من البلاعم الكبيرة على تحفيز الأستجابة المناعية للمضيف وهذا يعزز دور الذيفان الكامل في التمنيع. اذ أشار (20) الى أنه على الرغم من أن الأضداد المعادلة لذيفان الجمرة الخبيثة توجّه لمكونات السمدمية (Toxaemia)، الا أن الاستجابة المناعية لعوامل ضراوة اضافية أو مستضدات جسمية في البوغ أو الخلية الخضرية ربما تكون حاسمة لتطوير مناعة كاملة ضد الجمرة الخبيثة وأن أحسن لقاح يجب أن يستهدف كل من السمدمية والأنتانية (Septicemia)، كما هو الحال في اللقاح البشري للجمرة الخبيثة المستخدم بصورة شائعة في الولايات المتحدة والذي يدعى BioThrax™ أو Anthrax Vaccine Adsorbed (AVA) فهو يتكون من السائل الطافي المرتبط بهيدروكسيد الألمنيوم لنواتج التخمر الزرعي لعترة *B. anthracis* منتجة للذيفان وغير مكونة للمحفظة (31) ،اذ بين(20) أن هذا اللقاح يحتوي بصورة رئيسة على المستضد الحامي وكميات غير محددة من العامل القاتل وعامل الخزب فضلا عن احتوائه على بعض المستضدات الجسمية ، فهو بذلك مشابه نوعا ما للقاح الذيفان الخام المستخدم من قبلنا ، فالأول قادر على استهداف كل من السمدمية والانتانية وهذا مما يجعله يملك فعّالية واقية أفضل ضد الجمرة الخبيثة مقارنة باللقاح المعتمد على المستضد الحامي المتداخل وراثيا recombinant (rPA) والذي يجري تطويره بصورة واسعة.

بينت نتائج الدراسة حدوث استجابة مناعية خلطية بعد تمنيع خنازير غينيا بالذيفان سواء بطريقة الحقن تحت الجلد أو بالتقطير داخل الأنف. اذ أكدّ (32) أن تمنيع الفئران بالمستضد الحامي أعطى معيار حجمي عالي للأجسام المناعية (IgG) بفحص الاليزا بعد تمنيعها بالحقن تحت الجلد أو داخل الأنف، وكان الصنف IgG1 هو السائد في كلتي الطريقتين، بينما لوحظ الصنف IgA بمعيار عال فقط في الفئران الممنعة داخل الأنف.

بهذه الدراسة تمكنا من قياس الاستجابة الخلطية بفحص الأ ليزا باستخدام مستضد الأنثراكسين المحضّر بالطريقة المحّورة(24) وقد ثبتت كفاءته في ذلك. جاءت نتائج التقطير داخل الأنف أوطأ بقليل من تلك التي سجلت بطريقة الحقن تحت الجلد، اذ بلغ معدل الكثافة الضوئية 1.181 ± 0.002 نانوميتر للتقطير داخل الأنف و 0.07 ± 1.660 نانوميتر لمجموعة الحقن تحت الجلد، فقد تكون أحد الأسباب المؤدية لذلك تعزى الى أن اعطاء اللقاح داخل الأنف يتطلب اضافة عامل مساعد (Mucosal adjuvant)، اذ بين (14) أن تمنيع الفئران بـ rPA مع ذيفان الكوليرا Cholera Toxin(CT) كعامل مساعد حفزّ انتاج مستويات عالية من الأضداد

من صنف IgG1 و IgG2b خاصة بالمستضد الحامي في بلازما الدم، فضلا عن انتاج IgA في البلازما و secretory IgA خاصة بالمستضد الحامي في اللعاب وغسول الأنف (Nasal washes) وخلاصات البراز عند استخدام جرعة أعلى من rPA، ووجد أن خلايا Tcells $CD4^+$ في الفئران الممنعة بـ rPA و CT عن طريق الأنف تفرز مستويات منخفضة من المدورات الخلوية نوع (CD4+ Th1-type cytokines) ولكنها أظهرت مستويات مرتفعة من IL-4 و IL-5 و IL-6 و IL-10 مقارنة بالمناعة المنخفضة المتولدة من اعطاء rPA لوحده. وهذا يتفق مع (33) فقد وجد أن تمنيع الفئران داخل الأنف باستخدام rPA مع العامل المساعد nanoemulsion تسبب في معيار عال من الأضداد في هذه الحيوانات مقارنة بالتي أعطيت اللقاح الحاوي على rPA لوحده أو rPA مع الشب أو عوامل مساعدة أخرى. وبين (19) أن اعطاء rPA الحر داخل الأنف غير فعّال مقارنة باعطائه ممزوجا مع عامل مساعد مخاطي ، اذ أن اقـران rPA بـ Polymericmicrospheres يمنحـه فوائـد عـدّة منها أن عملية التغليف(encapsulation) ليس فقط تحمي PA من التحطيم بفعل أنزيمات المضيف ولكنها أيضا تعرض PA في شكل دقائقي عالي المناعة (immunogenic) الذي يسمح باستعماله على الطبقة المخاطية للأنف بدلا من الحقن، لكن على الرغم من أن اعطاء الفئران جرعتين داخل العضلة ولدت معيار أعلى من الأضداد عند المقارنة بجرعتين داخل الأنف الأ أن الطريقة الأخيرة تفضل على الحقن العضلي المستعمل بصورة شائعة في البشر لكون التمنيع عند السطوح المخاطية يحث مناعة موضعية واقية فعّالة وبدون الحاجة الى الحقن.

قد يعود السبب في الأنخفاض النسبي للمعيار الحجمي للأضداد عند استخدامنا طريقة التقطير داخل الأنف مقارنة بالحقن تحت الجلد الى صغر الجرعة المستخدمة (8 قطرات) فقد أوضح (20) أن المعيار الحجمي للأضداد المتكونة تجاه PA يعتمد على الجرعة (dose-dependent) ، فوجد أن اعطاء جرعة مفردة من لقاح BioThrax™ حتى عند أوطأ جرعة مستخدمة وهي 7.5 مايكرولتر أظهر معيار حجمي قوي من الأضداد الموجهة للمستضد الحامي (anti-PA IgG) من صنف IgG1 و IgG2a بعد ثلاثة أسابيع من التمنيع، ووصل مستوى الأضداد الى قمته بعد خمسة أسابيع من اعطاء اللقاح. أما مجموعتا الفئران التي أعطيت جرعة 15 و 30 مايكرولتر فقد أظهرت أعلى معيار حجمي من IgG عند المقارنة مع المجموعة التي أخذت الجرعة 7.5 مايكرولتر بعد خمسة أسابيع من التمنيع.

بين الباحثون أعلاه(20) أن التمنيع داخل الأنف باستعمال لقاح BioThrax™ والذي ربما يشابه في بعض مكوناته للقاح الذيفان الخام الذي استخدمناه في هذه الدراسة ماعدا احتواء الأول على هيدروكسيد الألمنيوم كعامل مساعد قادر على تحفيز استجابة مناعية مهمة تمثلت بـ Th1 و Th2 مع سيادة الأخيرة موجهة للمستضد الحامي قادرة على معادلة سمية الذيفان القاتل فضلا

عن أن التمنيع بهذا اللقاح داخل الأنف أظهر secretory IgA كذلك، مما تسبب في تكّون مناعة مخاطية وجهازية واقية بالفئران ضد التحدي بأبواغ الجمرة الخبيثة.

أظهرت الدراسة بعد كل ما تقدم امكانية التمنيع ضد الجمرة الخبيثة والتي أجريت لأول مرة بتمنيع خنازير غينيا بالذيفان الخام عن طريق التقطير داخل الأنف والتي ننصح باجراء دراسات موسعة حول امكانية اعطاء لقاحات الجمرة الخبيثة سواء لقاح الأبواغ الحي المضعف أو مكونات الذيفان عن طريق الأنف ودراسة مدة المناعة الواقية التي توفرها طريقة التمنيع هذه بالمقارنة مع طرق الحقن وتقييم الاستجابة الخلطية وخاصة mucosal anti-PA IgA في اللعاب وغسول الأنف والمهبل وغسول القصبة الهوائية والأسناخ الرئوية bronchoalveolar (lavages) فضلا عن التوجه الى دراسة التأثيرات الجانبية لطريقة التمنيع داخل الأنف ومواصلة الدراسات بهذا الجانب واجراء تجارب التحدي باستخدام عتر ضارية مثل Ames أو 17JB أو Vollum وغيرها لتقييم كفاءة التمنيع داخل الأنف كما وننصح باجراء دراسات مكثفة حول انتاج لقاحات جديدة ضد المرض تعطى بالأنف عن طريق التقطير أو بشكل رذاذ (spray).

المصادر

1-Mahlandt,B.G.; Klein, F.; Lincoln, R.E.; Haines,B.W.; Jones, W.I.; Jr and Friedman, R.H. (1966). Immunologic studies of anthrax. IV: Evaluation of the immunogenicity of three components of anthrax toxin. J.Immunol. 96(4): 727-733.

2-Ristroph, J.D. and Ivins, B.E. (1983). Elaboration of *Bacillus anthracis* antigens in a new , defined culture medium. Infect. Immun. 39(1): 483-486.

3-Turnbull, P.C.B.; Leppla, S.H.; Broster, M.G.; Quinn, C.P. and Melling, J. (1988). Antibodies to anthrax toxin in humans and guinea pigs and their relevance to protective immunity. Med.Microbiol. Immunol . 177(5): 293-303.

4-Nass, M. (1999). New vaccines and new vaccine technology: Anthrax vaccine. Infectious Disease Clinics of North America. 13(1): 187-209. (Internet)

5- Demicheli, V.; Rivetti, D.; Deeks, J.J.; Jefferson,T. and Pratt, M. (1998). The effectiveness and safety of vaccines against human anthrax: a systematic review. Vaccine. 16(9/10): 880-884.

6- Little, S.F.and Knudson,G.B. (1986). Comparative efficacy of Bacillus anthracis live spore vaccine and protective antigen vaccine against anthrax in the guinea pig. Infect.Immun.52(2): 509-512.

7- Ezzell, J.W. and Abshire, T.G. (1988). Immunological analysis of cell-associated antigens of Bacillus anthracis. Infect.Immunol.56(2): 349-356.

8- Cohen,S.; Mendelson, I.; Altboum, Z.; Kobiler, D.; Elhanany,E.; Bino,T.; Leitner, M.; Inbar, I.; Rosenberg,H.; Gozes,Y.; Barak,R.; Fisher, M.; Kronman, C.; Velan, B. and Shafferman,A. (2000). Attenuated nontoxinogenic and nonencapsulated recombinant Bacillus anthracis spore vaccines protect against anthrax. Infect. Immun.68(8): 4549-4558.
9- Brossier, F.; Mock, M. and Sirard, J.C. (1999). Antigen delivery by attenuated Bacillus anthracis: new prospects in veterinary vaccines. J.Appl. Microbiol. 87: 298-302.
10- Mock, M.; Levy, M. and Brossier,F. (2001). Vaccine research at Pasteur Institute. 4th International Conference on Anthrax (2001). Available from : http://www.asmusa.org/mtgsrc/Anthrax ProgBook.pdf
11- Turnbull, P.C.B. (1991). Anthrax vaccines: past, present and future. Vaccine . 9: 533-539.
12- Shafazand, S.; Doyle, R.; Ruoss, S.; Weinacker, A. and Raffin, T.A. (1999). Inhalational anthrax: epidemiology, diagnosis, and management. Chest. 116: 1369-1376.
13-Lew, D. and Garbino, J. (2003). Bacillus anthracis (Anthrax). Curr.Treat.Optin.Infect.Dis.5: 409-418. (Internet)
14- Boyaka, P.N.; Tafaro,A.; Fischer,R.; Leppla, S.H.; Fujihashi,K. and McGhee, J.R. (2003). Effective mucosal immunity to anthrax : Neutralizing antibodies and Th cell responses following nasal immunization with protective antigen. J. Immunol. 170: 5636-5643.
15- Dixon, T.C.; Meselson, M.; Guillemin, J. and Hanna,P.C. (1999). Anthrax. N. Engl. J. Med. 341(11): 815-826.
16-Titball, R.W. and Manchee, R. J. (1987). Factors affecting the germination of spores of Bacillus anthracis. J. Appl. Bacteriol.62: 269-273. 17- Jernigan, J.A.; Stephens, D.S.; Ashford,D.A.; Omenaca, C.; Topiel, M.S.; Galbraith, M.; Tapper,M.; Fisk,T.L.; Zaki,S.; Popovic,T. et al. (2001). Bioterrorism- related inhalational anthrax: the first 10 cases reported in the United States. Emerg. Infect. Dis. 7(6): 933-944.
18- Inglesby, T.V.; Toole, T.O.; Henderson, D.A.; Bartlett, J.G. et al. (2002). Anthrax as a biological weapon: Updated recommendations for management. JAMA. 287(17): 2236-2252.
19-Zucker, M. (2002).Experimental anthrax vaccine given nasally. Pulmonary Reviews. Vol.7. No.8 .(Internet)
20- Zeng, M.; Xu, Q. and Pichichero,M. (2007). Protection against anthrax by needle-free mucosal immunization with human anthrax vaccine. Vaccine. 25(18): 3588-3594. (Internet)
21- NewsRx Article (2007). Anthrax- Research reports on anthrax vaccines from university of Rochester provide new insights. This article was prepared by Bioterrorism Week editors. (Internet)
22- Haines, B.W.; Klein, F. and Lincoln,R.E. (1965). Quantitative assay for crude anthrax toxins. J. Bacteriol. 89(1): 74-83.

23- Shlyakhov, E.; Shoenfeld, Y.; Gilburd, B. and Rubinstein, E. (2004). Evaluation of Bacillus anthracis extractable antigen for testing anthrax immunity. Clin. Microbiol. Infect. 10(5): 421-424.

24- الجبوري، انعام جاسم لفتة (2007). استخدام مادة الأنثراكسين المحورة وتقييمها من ناحية الاستجابة المناعية الخلوية والتغيرات المرضية النسجية في الحيوانات المختبرية. المجلة الطبية البيطرية العراقية. المجلد 31 ، العدد 2 ، ص: 94 – 104 .

25- Todar,K. (2001). Bacillus anthracis and anthrax. Bacteriology 330 Home Page. Available from: http://www.bact.wisc.Edulbact330/lecture anthrax .

26- Ezzell , J.W.; Ivins, B.E. and Leppla, S.H. (1984). Immunoelectro-phoretic analysis, toxicity, and kinetics of in vitro production of the protective antigen and lethal factor componentsof Bacillus anthracis toxin. Infect. Immun. 45(3): 761-767.

27- الهيتي، شهاب أحمد لافي (1986). دراسة حول انتاج ذيفان عصية الجمرة الخبيثة *Bacillus anthracis* ومدى فعاليته بالتمنيع . رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري – الأحياء المجهرية، جامعة بغداد.

28- Friedlander, A.M. (1986). Macrophages are sensitive to anthrax lethal toxin through an acid- dependant process. J. Biol. Chemist. 261(16): 7123-7126.

29- Hanna, P.; Acosta, D. and Collier, R. (1993). On the role of macrophage in anthrax. J. Proc. Natl. Acad. Sc. 90:10198-10291.

30-Friedlander, A.M. (1997) . Anthrax. In: Textbook of Military Medicine :Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. Zajtchuk, R.; Bellamy, R. Eds. Washington, D.C.: Office of the Surgeon General, US Department of the Army. PP: 467-478.

31- Friedlander, A.M.; Pittman, P.R. and Parker, G.W. (1999). Anthrax vaccine: Evidence for safety and efficacy against inhalational anthrax. JAMA. 282(22): 2104- 2106.

32- Gaur, R.; Gupta, P.K.; Banerjea, A.C. and Singh, Y. (2002). Effect of nasal immunization with protective antigen of Bacillus anthracis on protective immune response against anthrax toxin. Vaccine. 20: 2836-2839.

33- Deitch, S.R. and Nuzzo, J. (2007). Study shows new adjuvant , nasal spray vaccine may offer protection against anthrax. Center for Biosecurity.