دراسة مقارنة الاستجابة المناعية الخلوية للأنثراكسين المحضر بطريقة محّورة و مستضدات مستخلصة من جرثومة الجمرة الخبيثة(*Bacillus anthracis*)

انعام جاسم لفتة الجبوري و زاهد سعدون عزيز وغازي موسى الخطيب

وحدة الأمراض المشتركة–كلية الطب البيطري– جامعة بغداد– بغداد –العراق

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية المقارنة بين مادة الأنثراكسين المحضرة بالطريقة المحّورة باستخدام جدار جرثومة الـ *Bacillus anthracis* عترة ستيرن (34F2) غير الضارية مع مستضدات محضرة من الجرثومة نفسها وتشمل المستضد 40/1 والمستضد 40/1 المموصد فضلا عن الذيفان الخام. جرت المقارنة بينها من ناحية تحفيز الاستجابة المناعية الخلوية في خنازير غينيا اذ منعت الحيوانات بطريقة الحقن تحت الجلد بلقاح الجمرة الخبيثة البيطري بجرعتين وبعد أربعة عشر يوما من جرعة التقوية أجري الفحص الجلدي بالمستضدات المحضرة وكان أفضلها الأنثراكسين اذ بلغ معدل قطر الاحمرار 16.66 ملم وفرق تثخن الجلد 2.3 ملم بعد 24 ساعة، وكانت النتائج متقاربة للمستضد 40/1 ونظيره المموصد اذ سجل الأول معدل قطر احمرار 12.5 ملم وفرق تثخن 2.25 ملم و الثاني 12.8 ملم وفرق تثخن 1.66 ملم على التوالي، في حين سجل الذيفان أخفض المعدلات الحسابية لقطر الاحمرار(7.8 ملم) بعد 24 ساعة. أما مقارنة المستضدات من ناحية التغيرات النسجية التي أحدثتها في جلد الحيوانات فكانت الأفضلية للانثراكسين الذي أعطى صورة نموذجية لتفاعل فرط الحساسية الجلدي المتأخر.

Comparative cellular immune response study of anthraxin prepared by a modified method with antigens extracted from *Bacillus anthracis*

An'am J.L. Al-Juboury, Zahid S. Aziz and Ghazi M. Al-Khatib
Zoonoses Diseases Unit−College of Vet. Med.-Baghdad University
Baghdad -Iraq

Summary

The study was aimed to comparison of anthraxin prepared by a modified method from cell-wall extract of avirulent *B .anthracis* strain 34F2(Sterne) with antigens extracted from the same strain as 1/40 antigen, autoclaved 1/40 and the crude toxin. These antigens were compared on their induction of cell-mediated immunity (CMI) in guinea pigs. Animals were immunized and boosted subcutaneously with the Sterne live veterinary anthrax vaccine. Two weeks after the booster dose, animals were skin-tested with the four antigens. Anthraxin was the most active antigen which recorded 16.66 mm a mean of erythema and 2.3 mm a difference of skin thickness after 24 hours. Both 1/40 and autoclaved 1/40 antigens gave approximately the same results which were 12.5 mm as a mean of erythema and 2.25 mm skin thickness for the first one; and 12.8mm ,1.66mm for the other respectively. The toxin showed the lowest results of erythema 7.8 mm with edema. These antigens were also compared according to the histological changes on their sites of inoculation. Marked (typical) picture of delayed type of hypersensitivity (DTH) reaction was occurred for anthraxin.

المقدمة

يسبب مرض الجمرة الخبيثة جرثومة ال *B .anthracis* وهي موجبة لصبغة كرام مكونة للأبواغ وهي منتشرة في مناطق واسعة من العالم (1)،ولا تقتصر اصاباتها على الحيوانات البرية بل تتعداها الى الحيوانات الداجنة مشكلة بذلك تهديدا اقتصاديا بالغ الخطورة (2).

تصاب الحيوانات من خلال تماسها مع الابواغ الموجودة بالتربة، أما الانسان فيصاب بصورة عرضية عند التماس مع حيوانات مصابة أو منتجاتها الملوثة بالأبواغ(3)، ويسبب المرض نسبة هلاكات عالية في معظم أنواع الحيوانات وخاصة اكلات الأعشاب وأكثرها حساسية الأبقار والأغنام والماعز والخيول (4).

تعتمد الاختبارات التشخيصية على عزل الجرثومة وتوصيفها والتي ربما لا تكون مناسبة في الأشخاص أو الحيوانات التي عولجت بالمضادات الحيوية حتى ولو لفترة قصيرة (5) كما وأن

الفحوصات المصلية غير مجدية للكشف عن المرض في الحالات الحادة لكون الأجسام المضادة الخاصة بالمرض تظهر في المراحل المتأخرة منه وتختفي في الحالات المعالجة (6) ، وكبديل للفحوصات التأكيدية أستخدم فحص الأنثراكسين الجلدي للكشف عن الاستجابة المناعية الخلوية المتكونة ضد المرض مما يخدم في التشخيص السريع للحالات الحادة للمرض فضلا عن تشخيص الحالات القديمة (Retrospective Diagnosis) (8,7).كما أستعمل فحص الأنثراكسين كعدة تشخيصية بصورة واسعة في شرق ووسط أوربا وقد صرح به من قبل منظمة الصحة العالمية منذ 1962 (10,9) لتقييم اللقاحات والحالة المناعية (immunological memmory) للحيوانات والاشخاص المصابين والممنعين ضد الجمرة الخبيثة(11). ونظرا لأهمية المرض ولكون العراق من المناطق الموبوءة صممت هذه الدراسة لايجاد مستضد أكثركفاءة في تشخيص المرض ولتقييم كفاءة لقاحاته من خلال مقارنة الأنثراكسين المحضر بالطريقة الجديدة مع مستضدات مستخلصة من جرثومة الجمرة الخبيثة .

المواد وطرائق العمل

أ- تحضير المستضدات

1- الأنثراكسين : حضر حسب طريقة (12) والمحورة من قبل الجبوري (13).

2- المستضد 1/40 والمموصد 1/40 : حضر حسب ما أشارت اليه (14) وبتركيز بروتين بلغ 6.793 و 5.69 ملغم/ مل على التوالي.

3- الذيفان : جرى الحصول على ذيفان عصية الجمرة الخبيثة من عترة ستيرن باستعمال وسط أحماض الكازامينو(Casamino acid medium) (15) والمحّورة من قبل الجبوري (14) وبتركيز بروتين بلغ 2.35 ملغم/ مل.

ب- تمنيع حيوانات التجارب

جرى تمنيع ستة خنازير غينيا بالغة ذكورا وأناثا بيضاء اللون بوزن تراوح بين 250-350 غم بلقاح الجمرة الخبيثة البيطري الحاوي على أبواغ عترة ستيرن بطريقة الحقن تحت الجلد (s/c) بجرعة 0.5 مل وبعد أسبوعين أعطيت جرعة تقوية بنفس الجرعة السابقة وطريقة الحقن (16)، في حين تركت أربعة حيوانات بدون تمنيع كحيوانات سيطرة.

ج- الفحص الجلدي

أجري بحقن الحيوانات داخل أدمة الجلد (I/d) بجرعة 0.1 مل من الأنثراكسين والمستضد 40/1 ونظيره المموصد والذيفان فضلا عن محلول دارئ الفوسفات الملحي المعقم Phosphate buffered

saline (PBS) بعد أربعة عشر يوما من جرعة التقوية بعد قص وحلاقة شعر منطقة الخاصرة واجراء التعقيم اللازم. قرأت النتائج بعد 24 و48 ساعة من الحقن متمثلة بالاحمرار وزيادة تثخن الجلد (17).وحقنت حيوانات السيطرة بالمستضدات بالجرعة السابقة نفسها لغرض المقارنة.

د- الفحص النسجي

أخذت عينات بسمك 1سم^3 من مناطق التفاعل الظاهرة على الجلد بعد 48 ساعة من اجراء الفحص الجلدي وثبتت في محلول دارئ الفورمالين المتعادل بتركيز 10% وممرت وقطعت وصبغت بالهيماتوكسلين والايوسين حسب طريقة (18).

النتائج

أ- نتائج الفحص الجلدي

1- للأنثراكسين :- سجل الأنثراكسين أعلى المعدلات الحسابية لقطر منطقة الاحمرار اذ بلغت 16.66 و 12.8 ملم بعد 24 و 48 ساعة على التوالي. في حين سجل فرق تثخن الجلد معدلا بلغ 2.3 ملم بعد 24 ساعة و2 ملم بعد 48 ساعة (الجدول 1 والشكل 1).

2- للمستضد 1/40:- سجل هذا المستضد نتائجا أخفض من الأنثراكسين اذ بلغ معدل قطر منطقة الاحمرار 12.5 ملم بعد 24 ساعة وانخفض الى 7.6 ملم بعد 48 ساعة، أما فرق التثخن فسجل 2.25 و 2.33 ملم بعد 24 و 48 ساعة على التوالي (الجدول 2 والشكل 1).

3- للمستضد الموصد 1/40:- كانت نتائج الفحص الجلدي للمستضد 1/40الموصد مقاربة لنظيره المخفف فيما يخص قطر منطقة الاحمرار، اذ سجل 12.8 ملم و 8 ملم بعد 24 و 48 ساعة على التوالي ،أما فرق التثخن فكان أقل اذ بلغ 1.66 ملم بعد 24 ساعة و 2 ملم بعد 48 ساعة (الجدول 3 والشكل 1).

4- للذيفان:- لم يسجل الذيفان نتائجا جيدة بالفحص الجلدي ، اذ بلغ معدل قطر منطقة الاحمرار 7.8 ملم بعد 24 ساعة وبلون باهت والذي اختفى كليا بعد 48 ساعة، مع حصول وذمة في منطقة الحقن (الجدول 4 والشكل 1).

5- للسيطرة:-

كانت النتائج سالبة في حيوانات السيطرة سواء الممنعة المحقونة بمحلول دارئ الفوسفات الملحي المعقم أو غيرالممنعة المحقونة بالمستضدات السابقة، كما في الجداول 1 و2 و3 و4 .

ب- نتائج الفحص النسجي

1- للأنثراكسين :- أظهرالفحص المجهري ارتشاحا للخلايا الالتهابية ولاسيما البلاعم والعدلات والحمضات في منطقة الأدمة وحول الأوعية الدموية وقد امتدت النضحة الالتهابية الى الطبقة العضلية (بين اليافها) ، فضلا عن احتقان الأوعية الدموية وتكفيف خلوي حولها (الشكل 2).

2- للمستضد 1/40 :- لوحظ ارتشاح متوسط الشدة لخلايا العدلات ووحيدة النواة (Mononuclear cells) في منطقة الأدمة أقل مما سجل في الأنثراكسين وأكثر من المستضد الممومصد فضلا عن احتقان الأوعية الدموية(الشكل 3).

3- للمستضد الممومصد 1/40:- لوحظ ارتشاح معتدل للخلايا وحيدة النواة والعدلات في طبقة الأدمة مع احتقان الأوعية الدموية (الشكل 4).

4- للذيفان :- بينت نتائج الفحص المجهري ارتشاح طفيف للخلايا وحيدة النواة في منطقة الأدمة فضلا عن احتقان الأوعية الدموية (الشكل 5).

جدول (1): نتائج الفحص الجلدي للأنثراكسين بعد 24 و48 ساعة من الحقن.

رقم الحيوان	فرق تثخن الجلد / ملم		قطر منطقة الاحمرار / ملم	
	بعد 24 ساعة	بعد 48 ساعة	بعد24 ساعة	بعد 48 ساعة
1	2	1	17	14
2	3	2	17	13
3	1	2	13	12
4	1	1	20	13
5	4	4	18	12
6	3	2	15	13
المعدل الحسابي	2.3	2	16.66	12.8
سيطرة ممنع دارئ الفوسفات الملحي	0	0	0	0
سيطرة غير ممنع الأنثراكسين	0	0	0	0

جدول (2): نتائج الفحص الجلدي للمستضد 1/40 بعد 24 و 48 ساعة من الحقن.

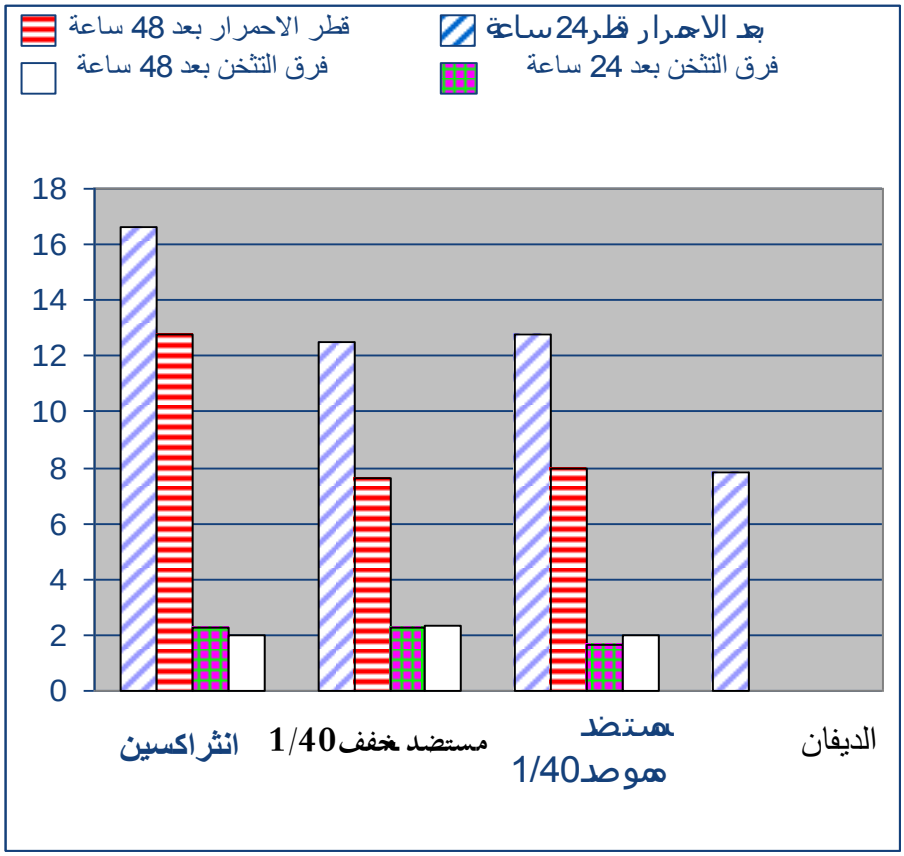
رقم الحيوان	فرق تثخن الجلد/ ملم		قطر منطقة الاحمرار / ملم	
	بعد 24 ساعة	بعد 48 ساعة	بعد24 ساعة	بعد 48 ساعة
1	4	3	10	5
2	2	2	14	9
3	2	3	18	8
4	1	1	12	6
5	2.5	3	11	8
6	2	2	10	9.5
المعدل الحسابي	2.25	2.33	12.5	7.6
سيطرة ممنع دارئ الفوسفات الملحي	0	0	0	0
سيطرة غير ممنع المستضد 1/40	0	0	0	0

جدول (3): نتائج الفحص الجلدي للمستضدالمموصد 1/40 بعد 24 و 48 ساعة من الحقن.

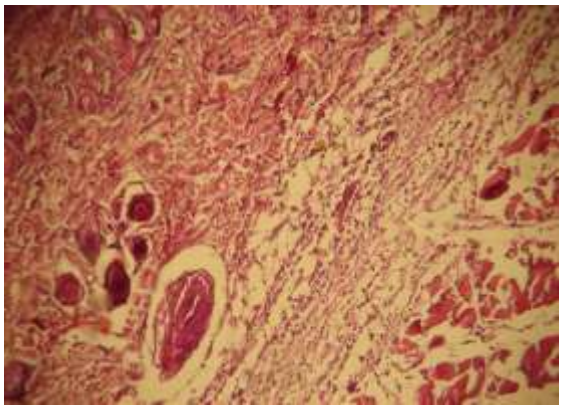
رقم الحيوان	فرق تثخن الجلد / ملم		قطر منطقة الاحمرار / ملم	
	بعد 24 ساعة	بعد 48 ساعة	بعد24 ساعة	بعد 48 ساعة
1	2	2	12	8
2	1	1	14	8
3	1	2	16	7
4	2.5	3	13	8
5	1.5	2	12	8
6	2	2	10	9
المعدل الحسابي	1.66	2	12.8	8
سيطرة ممنع دارئ الفوسفات الملحي	0	0	0	0
سيطرة غير ممنع المموصد 1/40	0	0	0	0

جدول (4) :نتائج الفحص الجلدي للذيفان بعد 24 و 48 ساعة من الحقن.

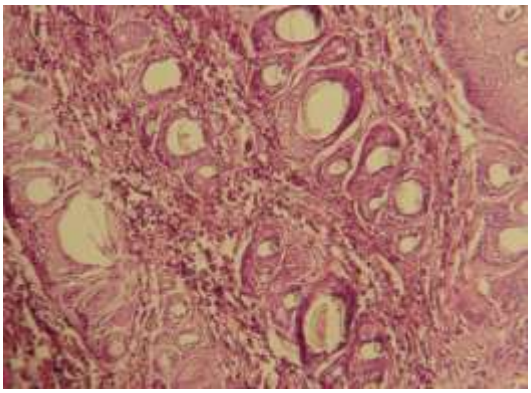
رقم الحيوان	قطر منطقة الاحمرار/ ملم	
	بعد24 ساعة	بعد 48 ساعة
1	0	0
2	14	0
3	8	0
4	11	0
5	7	0
6	7	0
المعدل الحسابي	7.8	0
سيطرة ممنع دارئ الفوسفات الملحي	0	0
سيطرة غير ممنع الذيفان	0	0



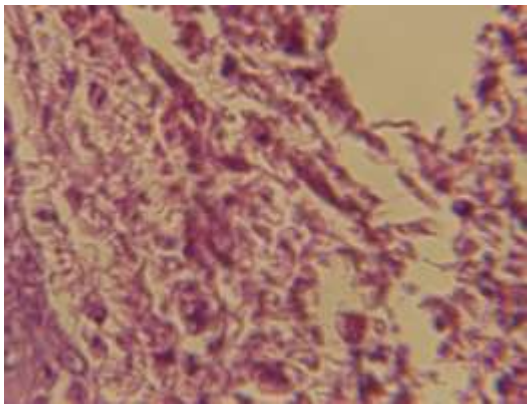
شكل(1) :المعدلات الحسابية لفرق تثخن الجلد وقطر الاحمرار بعد 24 و48 ساعة من حقن المستضدات المختلفة لجرثومة ال *B .anthracis* .



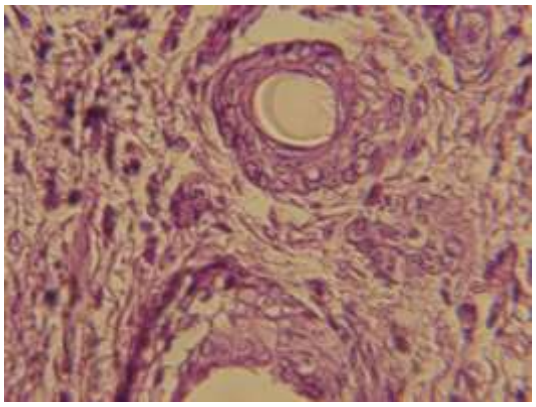
شكل(2):مقطع نسجي في جلد أحد الحيوانات الممنعة والمحقونة بالأنثراكسين يبين ارتشاح الخلايا وحيدة النواة وخاصة اللمفية والبلعمية في الأدمة والنسيج تحت الجلد (H&E X200)



شكل(3):مقطع نسجي في مكان حقن المستضد 1/40 لأحد الحيوانات الممنعة يوضح ارتشاح الخلايا وحيدة النواة في الأدمة واحتقان الأوعية الدموية (H&E X200)



شكل(4):مقطع نسجي لمكان حقن المستضد المموصد 1/40 يبين ارتشاح معتدل للخلايا وحيدة النواة في منطقة الأدمة (H&E X400)



شكل(5):مقطع نسجي لمنطقة حقن الذيفان يظهر ارتشاح طفيف جدا للخلايا وحيدة النواة في الأدمة (H&E X400)

المناقشة

جرى في الدراسة الحالية تقييم ثلاثة مستضدات مستخلصة من جرثومة الجمرة الخبيثة عترة ستيرن وهي الأنثراكسين والمستضد المخفف 1/40 ونظيره المموصد 1/40 فضلا عن الذيفان ، وجرى تقييمها من ناحية الأستجابة المناعية الخلوية في خنازير غينيا باستخدام فحص فرط الحساسية الجلدي المتأخر.أن أعلى المعدلات الحسابية لقطر منطقة الاحمرار أو فرق تثخن الجلد سجلت للأنثراكسين تلاه المستضد المخفف 1/40 ونظيره المموصد رغم عدم احتواء الأول على البروتين الذي جرى ترسيبه باستخدام حامض الخليك(Acetic acid) واحتوائه على نسبة عالية من السكريات بلغت 10.5 ملغم /100 مل.

اذ تتكون مادة الأنثراكسين من معقد من ببتيدات كلايكان ومتعدد السكريات وهي لا تحتوي على البروتين (19) ، وهذه المعقدات بدورها مكونة من أحماض أمينية وسكريات أمينية متمثلة بـ Glutamic acid ، Alanine ، M-diamino pemilic acid ، N-acetylglucosamine ، Muramic acid و Galactose (20) وهذا ما يعكس القراءات العالية للفحص الجلدي اذ ان القابلية المستضدية (Immunogenicity) للمستضد تعتمد على عوامل متعددة أهمها: حجم المستضد، ودرجة تعقيده، والقابلية الانهضامية ، والشكل، وتعرض المحددات المستضدية (Accessibility)ودرجة الغرابة (foreignness)(21) وعلى النقيض مما أشار اليه (22) من أن فرط الحساسية الجلدي المتأخر تحدثها مستضدات بروتينية ومتعددة الببتيدات فقط مع بعض الاستثناءات.

سجل المستضدان 1/40 ونظيره المموصد نتائجا متقاربة بالفحص الجلدي ولكنهما أخفض مما سجله الأنثراكسين رغم احتوائهما على نسبة عالية من البروتين نستدل من ذلك أن البروتين ليس في بعض الحالات ضروريا في حث تفاعلات فرط الحساسية المتأخر الجلدي. ففي دراسة أجراها الباحثون (12) بمقارنة الأنثراكسين ومستضد أسكولي الثابت بالحرارة مع المستضد المستخلص البروتيني المنقى جزئيا وجد أن أفضلها في الفحص الجلدي كان الأنثراكسين ومستضد أسكولي في حين كانت المعدلات أخفض في المستضد البروتيني.

جاءت نتائج الفحص النسجي مطابقة لما حصلنا عليه بالفحص الجلدي، اذ أظهر الأنثراكسين صورة نموذجية لفحص الحساسية الجلدي المتأخر تختلف عمّا لوحظ في المستضدات الأخرى، اذ لوحظ بالأدمة بالاضافة الى الخلايا البلعمية والعدلات شوهدت الحمضات فوجود الأخيرة يؤكد أن فرط الحساسية كان من النوع المتأخر، اذ أكّد (23) وجود علاقة ما بين النوع المتأخر لفرط الحساسية وتجمع الحمضات ، كما انها قد توجد

فـي تفـاعلات فـرط الحساسـية الآنيـة (Arthus reaction) الـذي تكـون فيـه الخلايـا السـائدة هـي وحيـدة النـواة (24) وهـذا يـدعم مـا آشـار اليـه(25) مـن أن الأنثراكسـين لا يسـبب حـدوث تفاعـل التـأق (Anaphylactic reaction) أو تقرحـات (Ulcerations) أو فقاعـات (Bubbles) في مناطق حقنه بالجلد .

سـجل المستضـدان 1/40 ونظيـره الموصـد قـراءات متماثلـة بـالفحص النسـجي لكـن ارتشـاح الخلايـا كـان أقـل ممـا لـوحظ بالأنثراكسـين. فـي حـين سـجل الـذيفان أقـل المعـدلات بـالفحص الجلـدي فيمـا يخـص قطـر منطقـة الاحمـرار الـذي كـان باهتـا خـلال 24 سـاعة الأولـى واختفـى كليـا بعـد 48 سـاعة ممّـا يـدل علـى أنـه لـيس تفـاعلا مـن نـوع فـرط الحساسـية الجلـدي المتـأخر، أمـا تـثخن الجلـد فيعـزى الـى حصـول الوذمـة مثلمـا أكـدت نتـائج الفحـص النسـجي التـي أظهـرت ارتشـاحا طفيفـا جـدا للخلايـا وحيـدة النـواة بالأدمـة وهـذا يتفـق مـع مـا أشـار اليـه (26) مـن أن مستحضـرات الـذيفان الخـام تعيـق عمليـة الجـذب الكيميـائي للعـدلات ، كمـا وأن الـذيفان الخزبـي (Oedema toxin) يثبط عمليـة البلعمـة وانتـاج الأنترلـوكين 6 (IL-6) وعامـل تنخـر الـورم (Tumor necrosis factor) مـن قبـل الخلايـا وحيـدة النـواة ومـن ثـم يعيـق الوسـائل الدفاعيـة للمضـيف (27)، ويتفـق هـذا مـع مـا ذكـره (28) مـن أن الـذيفان يثـبط الاسـتجابة المناعيـة مـن النـوع Innate & adaptive immunity، وأظهـرت البحـوث الحديثـة التـي أجريـت فـي الفئـران أن كـل مـن العامـل الخزبـي والعامـل القاتـل يثبطـان تحفيـز الخلايـا اللمفاويـة التائيـة (T-lymphocytes) مـن قبـل المسـتقبل الموجـود علـى أسـطحها (T-cell receptor- mediated stimulation) (29).

يتبين لنا من كل ما تقدم أن أفضل مستضد سواء بالفحص الجلدي أو النسجي هو الأنثراكسين والذي ننصح باستعماله لتشخيص مرض الجمرة الخبيثة على مستوى الحيوانات الحقلية أوالانسان لاحقا فضلاعن تقييم كفاءة اللقاحات البشرية والبيطرية على حد سواء .

المصادر

1- Sastry, K.S.R.; Tuteja, U.; Santhosh, P.K.;Lalitha,M.K. and Batra,H.V. (2003).Identification of *Bacillus anthracis* by a simple protective antigen-specific m Ab dot- ELISA. J.Med.Microbiol,52: 47- 49.

2-Cherif, A. ; Borin ,S.; Rizzi ,A. ;Ouzari ,H. ;Boudabous ,A. and Daffonchio ,D .(2002).Characterization of a repetitive element polymorphism-polymerase chain reaction chromosomal marker that discriminates *Bacillus anthracis* from related species. J.Appl. Microbiol,93:456-462.

3- Patra, G.; Vaissaire, J.; Weber-Levy , M.; Doujet , C.L. and Mock ,M . (1998) . Molecular characterization of *Bacillus* strains involved in outbreaks of anthrax in France in 1997.J.Clin.Microbiol, 36(11):3412-3414.

4-Shafazand , S. ;Doyle ,R. ; Ruoss ,S .; Weinacker ,A; Raffin ,T.A .(1999). Inhalational anthrax: Epidemiology , Diagnosis and Management. Chest, 116: 1369-1376.

5-Pfisterer,R.M.(1991).Eine Milzbrand epidemie in derSchweiz : Klinische, Diagnostische und epidemiologische aspekte einer weitgehend vergessenen Krankheit . Schweiz. Med. Wochenschr, 121:813-825.

6-Dixon,T.C.;Meselson, M.;Guillemin,J. and Hanna,P.C.(1999).Anthrax. N. Engl. J. Med, 341(11): 815-826.

7- Shlyakhov, E.N. and Rubinstein ,E. (1996). Evaluation of the anthraxin skin test for diagnosis of acute and past human anthrax. Eur.J. Clin. Microbiol .Infect. Dis., 15(3): 242-245.

8- Migueles, S.A .and Tuazon , C.U.(2001). Anthrax in the new Millennium. Curr. Treat. Opin. in Infect. Dis., 3:247-258.

9- Shlyakhov, E.N. and Rubinstein ,E. (1994) .Human anthrax live vaccine. Vaccine, 12 : 727-730.

10- O.I.E. Office International des Epizooties Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. (2000) . Anthrax. 4th ed . Available from: http://www.oie.int/eng/norms/mmanual/A-00038.htm.

11-Shlyakhov ,E.N. and Rubinstein ,E.(1994). Delayed hypersensitivity after anthrax vaccination. I-Study of guinea pigs vaccinated against anthrax .Med. Trop., 54(1):33-37.

12- 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.

13- الجبوري، انعام جاسم لفتة(2007). استخدام مادة الانثراكسين المحّورة وتقييمها من ناحية الاستجابة المناعية الخلوية والتغيرات المرضية النسجية في الحيوانات المختبرية. المجلة الطبية البيطرية العراقية. المجلد 31، العدد 2، صفحة: 94 -104.

14- الجبوري، انعام جاسم لفتة (2004).دراسة تجريبية لانتاج مادة Anthraxin لتشخيص الاصابة بالجمرة الخبيثة في الحيوانات المختبرية. رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري ، جامعة بغداد.

15- Haines,B.W.;Klein,F. and Lincoln, R.E.(1965). Quantitative assay for crude anthrax toxins. J. Bacteriol., 89(1): 74-83.

16-Turnbull,P.C.B.;Broster,M.G.;Carman,J.A.; Manchee, R.J .and Melling ,J. (1986).Development of antibodies to protective antigen the lethal factor components of anthrax toxin in humans and guinea pigs and their relevance to protective immunity. J .Infect. Immun.,52(2):356-363.

17- Pearson, M.N. and Raffel , S.(1971).Macrophage- digested antigen as inducer of delayed hypersensitivity. J.Exp.Med.,133:494-505.

18- Luna, L.G. (1968).Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3th ed. Mc- Graw-Hill, New York.

19- Nagar, R., Pande,S. and Khopkar, U. (2006). Intradermal tests in dermatology- I: Tests for infectious diseases. Ind.J. Dermatol.Venereol. Leprol., 72(6): 461- 465.

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

21- خليفة ، خليفة أحمد (1991) . أسس علم المناعة. مطابع التعليم العالي /جامعة الموصل .

22- Collins, F.M.(1974) . Vaccines and cell- mediated immunity . Bacteriol. Rev .,38(4): 371-402 .

23- Cohen , S. and Ward , P.A.(1971) . Invitro and invivo activity of alymphocyte and immune complex – dependent chemotactic factor for eosinophils. J.Exp. Med., 133: 133 -146.

24- Tizard , I.R. (1987). An Introduction to Veterinary Immunology. 3 rd W.B. Saunders Company, Philadelphia. PP: 307-318.

25-Shlyakhov ,E.N. and Rubinstein, E. and Novikov, I. (1997). Anthrax postvaccinal cell mediated immunity in humans : Kinetics pattern. Vaccine.,15 (6/7): 631-636.

26- 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.

27- Bradley, K.A.; Morgridge , J.; Mourez, M.; Collier , R.J. and Young, J. A. T. (2001 . Identification of the cellular receptor for anthrax toxin . J. Nature ., 414: 225-229. 28- Chensue, S.W. (2003). Exposing a killer: Pathologyists Angle for Anthrax. Am. J. Pathol. 163: 1699- 1702.

29- Bioterrorism Anthrax Overview (2007). Anthrax: Current, comprehensive information on pathogenesis, microbiology, epidemiology, diagnosis, treatment, and prophylaxis. Center for Infectious Disease Research & Policy. Academic Health Center- University of Minnesota.