استخدام مادة الأنثراكسين المحّورة وتقييمها من ناحية الاستجابة المناعية الخلوية والتغيرات المرضية النسجية في الحيوانات المختبرية

انعام جاسم لفته الجبوري

وحدة الأمراض المشتركة /كلية الطب البيطري/جامعة بغداد

الخلاصة

جرى في هذه الدراسة تحضير مادة الانثراكسين بطريقة محّورة باستخدام الجدار الخلوي لجرثومة ال *Bacillus anthracis* عترة (*34F2(Sterne* واستخدمت في فحص الانثراكسين الجلدي لقياس مستوى الاستجابة المناعية الخلوية Cell mediated immunity(CMI) .اذ منعت خنازير غينيا بلقاح الجمرة الخبيثة البيطري بجرعتين تمنيعية بطريقة الحقن تحت الجلد ، وبعد أسبوعين من جرعة التقوية أجري الفحص الجلدي ،اذ سجلت معدلات عالية بلغت 15.6 ملم لقطر منطقة الاحمرار و 2.5 ملم بالنسبة لفرق تثخن الجلد مقارنة بالسيطرة. كانت نتائج الفحص النسجي مطابقة للنوع المتأخر من فرط الحساسية الجلدي تمثلت بارتشاح الخلايا الألتهابية ولا سيما العدلات والخلايا البلعمية والحمضات في منطقة الأدمة وحول الأوعية الدموية كذلك حصول أديما في منطقة الأدمة واحتقان الأوعية الدموية مع تكفيف خلوي حولها .

Using Modified Anthraxin And Its Evaluation For Testing Cell Mediated Immunity And Studying Histopathological Changes In Lab Animals

An' am J.L. Al-Jeboury

Zoonoses Diseases Unit/College of Veterinary Medicine/ Baghdad University

Summary

This study aims to apply a new procedure in preparation of anthraxin from cell wall extracts of a virulent *Bacillus anthracis* strain 34F2 (Sterne) .Anthraxin was evaluated for potential use as skin testing agent to measure cell-mediated immunity. Guinea pigs were immunized and boosted subcutaneously with Sterne live veterinary anthrax vaccine. Two weeks after the booster dose, animals were skin tested with the antigen which recorded

15.6mm as a mean of erythema and 2.5 mm difference of thickness as compared to the control. Histological changes corresponded with the delayed type of hypersensitivity (DTH) in which the changes involved infiltration of inflammatory cells particularly macrophages, neutrophiles and eosinophils in the skin dermis and in perivascular region in addition to accumulation of fluid (edema) in the dermis and congestion of blood vessels.

المقدمة

مرض الجمرة الخبيثة من الأمراض واسعة الأنتشار في العالم ازدادت خطورته نتيجة للأستخدامات اللاانسانية لأبواغ الجرثومة كعوامل حرب بيولوجية(1).رغم أن حدوث المرض انخفض في البلدان المتطورة لكنه لا يزال يشكل مشكلة صحية كبيرة في البلدان النامية (2)فهو من الأمراض المتوطنة(endemic) في عدد كبيرمن المناطق الزراعية بالعالم (3و4)،ومنها قطرنا العراقي(5).يتميز المرض بأعراضه غير الواضحة والتي غالبا ماتكون الموت المفاجئ بدون علامات مميزة(6)،هذه الحقيقة أظهرت أهمية وضرورة التشخيص المبكر للمرض فالأصابات الحادة لا يمكن التعويل على الفحوصات المصلية لتشخيصها لتأخر تكون الأضداد الخاصة بالمرض(7و8).أستخدم في السنين الأخيرة فحص الأنثراكسين الجلدي كبديل للأختبارات التأكيدية للكشف عن الأستجابة المناعية الخلوية المتكونة ضد المرض وهذا يخدم في التشخيص المبكر للحالات الحادة للمرض فضلا عن تشخيص الحالات القديمة(9).

أستخدم الفحص كعدة تشخيصية في الاتحاد السوفيتي وروسيا (10) ففي سنة 1957 أستخدم لمراقبة المناعة المتكونة بعدالاصابة أو التمنيع ضد الجمرة الخبيثة باستخدام منتوج الأنثراكسين (11)،لكن أول تصريح باستخدامه كان سنة 1962 الى الوقت الحاضر بقى يستخدم بصورة واسعة في شرق ووسط أوربا(12و13).لم يكن هنالك شيء واضح حول التركيب الكيميائي وطريقة تحضير هذه المادة فكانت المصادر العلمية تشير اليها بأشارات ضعيفة وغير مكتملة على سبيل المثال ما ذكره (14 و15) من أن هذه المادة عبارة عن خلاصات معقدة غير معروفة مشتقة من السائل الخزبي المتكون بعد حقن العتر المضعفة مثل عترة Zenkowskey أو العترة اللقاحية STI-1 تحت جلد الحيوانات المختبرية .وأوضح (16) الى أنها منتج حيوي (Biological product) مشتق من عتر جرثومة الجمرة الخبيثة منزوعة المحفظة وتتركب كيميائيا من معقد ثابت بالحرارة يتكون من متعدد السكريدات وبروتين وحوامض نووية ولا تحتوي على محفظة أو ذيفانات الجرثومة وغير حاوية على مواد حافظة أو مضادات حيوية.في حين أشار (17)الى أن مادة الأنثراكسين مشابهة لمشتقات البروتين المنقاة Purified protein derivatives(PPD) .

جرى في دراسة سابقة تحضير مستضدات من جرثومة الجمرة الخبيثة تستخدم بفحص الأنثراكسين بطرائق محورة من قبل (18) فالباحثون الذين أنتجوا مادة الأنثراكسين لم يعلنوا بشكل كامل وواضح طريقة تحضيرها عبر شبكة المعلومات الدولية ولا المجلات العلمية المتوفرة لدينا لذا جاءت هذه الدراسة لتحوير في طريقة تحضير مادة الأنثراكسين حسب الطريقة المعتمدة عالميا والتي أشار اليها الباحثون (19) تختلف عن سابقاتها تواكب المنتوج المتوفر تجاريا في الدول الأوربية والمعتمد عالميا في دول عدة لتشخيص مرض الجمرة الخبيثة في الانسان والحيوانات ولتقييم كفاءة اللقاحات البشرية والبيطرية على حد سواء.

المواد وطرائق العمل

أ- تحضير الأنثراكسين

جرى تحضير الأنثراكسين حسب طريقة (19) مع بعض التحويرات المذكورة وكما يأتي:-

1- تنمى جرثومة *B.anthracis* 34F2 strain (Sterne) لمدة 18- 20 ساعة بدرجة حرارة 37° م على وسط أكار نقيع القلب والدماغ المضاف اليه خلاصة الخميرة (yeast extract)[I] بنسبة 0.6% .

2- يفحص الزرع لغرض معرفة تجانسه (homogeneity) ونقاوته (purity) ،اذ يجب أن يحوي عند الفحص المجهري على 80% خلايا خضرية بشكل خيوط (filaments) و 20% بشكل عصيات وقليل من الأبواغ.

3- تحصد الجراثيم بوساطة الناشر (spreader) باستعمال محلول دارئ الفوسفات الملحي المعقم المتعادل (pH 7.3) وتغسل مرتان باستعمال المحلول نفسه بوساطة جهاز المنبذة (centrifuge) بسرعة 800g أي ما يعادل 2185 دورة/ دقيقة لمدة 30 دقيقة.

4- يجمع الراسب وهو بشكل كريات (pellet) ويعرض للموصدة (autoclave) لمدة 30 دقيقة بدرجة 120° م[II] وبعدها يوزع في أطباق معقمة ويجفف بدرجة حرارة الغرفة.

5-[I] تسحن الكريات الجافة (dried pellet) بوساطة هاون معقم وتزال منها الدهون (defatted) باستعمال كميات متساوية من الأيثر والكلوروفورم في جهاز السوكسليت (Soxsclet apparatus).

[I] لم يذكر الباحث النسبة

[II] عملية التجفيف استغرقت أربعة أشهر تقريبا بدرجة حرارة الغرفة فضلا عن التلوث الفطري المرافق للعملية لذلك لم نعمل بها ولا ننصح باجرائها.

6- يحل المسحوق الناتج بمزج 1 غم منه مع 100 مل من حامض الخليك (acetic acid) تركيزه(v/v) 1%.

7- يغلى العالق المتكون بدرجة 100° م لمدة 3 ساعات مع الرج المتكرر ،يبرد بدرجة حرارة الغرفة ، وبعدها يوضع في الثلاجة بدرجة 4° م لليوم التالي.

8- ينبذ العالق باستعمال جهاز المنبذة لمرتين بسرعة 3000g أي مايعادل 4200 دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة.

9- يصفى بعملية الترشيح باستخدام[II] ورقة ترشيح نوع 595، وتكرر العملية لحين الحصول على سائل صاف أصفر اللون.

10-يعدل الأس الهيدروجيني للراشح الى (pH 7.4) باستعمال هيدروكسيد الصوديوم(w/ v) %10.

11- يقاس تركيز البروتين باستخدام[5]* BCA protein Kit.

12- تقيم الخصوصية المناعية الكيميائية (Immunochemical specificity) للمنتج بوساطة فحص الاخترلوني باستعمال monospecific anthrax-precipitating immune serum ليعطي خط ترسيبي واحد بعد الحضن لليوم التالي.

13- يوزع مستحضر الأنثراكسين في قنان معقمة ويعرض للموصدة لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 120 °م وبعدها يحفظ في الثلاجة بدرجة 4-8 °م لحين الاستعمال .

ب- حساب نسبة السكريات

جرى قياس نسبة السكريات في الانثراكسين باستخدام عدة فرنسية حسب توصيات الشركة Biolabo.France (Kit).

ج-التمنيع

منعت خنازير غينيا بالغة أناثا وذكورا بيضاء اللون عددها ستة بجرعتي تمنيع بينهما مدة أربعة عشر يوما بطريقة الحقن تحت الجلد (s/c) وبجرعة 0.5مل باستعمال اللقاح البيطري المتوفر محليا والحاوي على أبواغ عترة ستيرن $5x10^6$بوغ/مل (20). حيوانات السيطرة وعددها ثلاثة تركت بدون تمنيع.

[I] التحوير/ أخذ الراسب ووضع في extraction thimbles مصنوعة من السيليلوز قياسها 50×10 ملم وهذه بدورها وضعت في thimble أكبر حجما وأزيلت منه الدهون باستعمال 100 مل من كل من الايثر والكلوروفورم في جهاز السوكسليت لمدة 5 ساعات تقريبا وبعد خروجه من الجهاز وضع المستخلص الموجود داخل thimble في درجة حرارة الغرفة لليوم التالي لكي يجف المستخلص وبعدها أجريت له عملية السحن وأصبح بشكل مسحوق.

[II] رشحنا بوساطة مرشحة زايتز (Seitz filter) باستخدام ورقة ترشيح قياسها 0.22 مايكرون

د- الفحص الجلدي

أجري فحص الحساسية الجلدي بعد اسبوعين من جرعة التقوية ،اذ حقنت الحيوانات الممنعة وغيرالممنعة بمادة الأنثراكسين ومحلول السيطرة (P.B.S) وبجرعة 0.1 مل داخل أدمة الجلد(I/ d) بعد تحضير منطقتي الخاصرة من قص وحلاقة الشعر وتعقيم المنطقة بالكحول .جرى قراءة تفاعلات الجلد بعد 24 و48 ساعة من حيث قطر الاحمرار وفرق تثخن الجلد (21).

هـ- الفحص النسجي

أخذت عينات بسمك 1 سم ^{3} من مناطق التفاعل الظاهرة على الجلد بعد 48 ساعة من اجراء الفحص الجلدي وحفظت في محلول دارئ الفورمالين المتعادل بتركيز 10% وأجريت لها العمليات الروتينية لتحضير الشرائح النسجية وبعدها صبغت بصبغة الهيماتوكسلين والايوسين لغرض دراسة التغيرات النسجية المرضية (22).

النتائج

1- نتائج الفحص الجلدي

سجل الأنثراكسين معدل قطر احمرار بلغ 15.6 ملم بعد 24 ساعة من الحقن مع ملاحظة وجود أوديما في منطقة الحقن وبلغ معدل فرق تثخن الجلد 2.5 ملم ،في حين انخفض معدلي قطر الاحمرار وفرق التثخن بعد 48 ساعة من الحقن اذ سجلا 12.1 ملم و 2.3 ملم على التوالي. فيما يخص محلول السيطرة لم يسجل أي نتيجة تذكر كذلك الحال بالنسبة للانثراكسين في حيوانات غير ممنعة وكما في الجدول (1).

2- نتائج الفحص النسجي

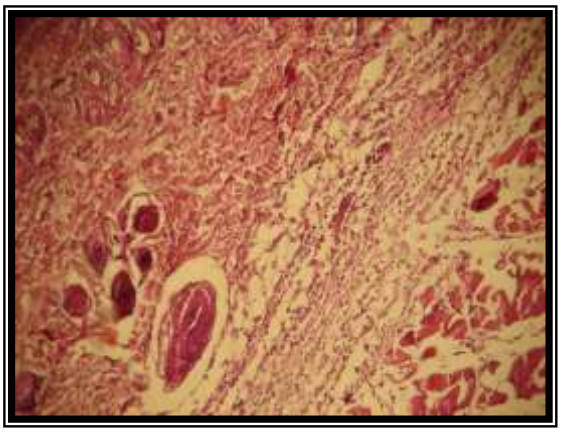
بين الفحص المجهري للشرائح النسجية لمنطقة حقن الأنثراكسين ارتشاح الخلايا الألتهابية ولاسيما العدلات والحمضات والخلايا البلعمية في منطقة الأدمة وحول الأوعية الدموية وقد امتدت النضحة الألتهابية الى ما بين الياف الطبقة العضلية كذلك لوحظ اوديما في منطقة الأدمة واحتقان الأوعية الدموية مع تكفيف خلوي حولها (شكل 1).

أما منطقة حقن محلول السيطرة (.P.B.S) فلم تسجل أي تغيرات نسجية تذكر (شكل 2).

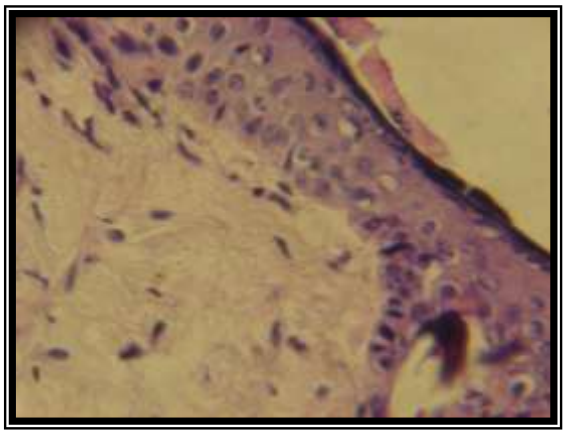
جدول (1): نتائج الفحص الجلدي للأنثراكسين مع السيطرة بعد 24 و48 ساعة من الحقن

رقم الحيوان	مواقع الحقن	فرق تثخن الجلد بالملم		قطر منطقة الاحمرار بالملم	
		بعد 24 ساعة	بعد 48 ساعة	بعد 24 ساعة	بعد 48 ساعة
1	R	2	1	17	14
	L	3	1	17	14
2	R	3	2	17	13
	L	3	3	13	11
3	R	1	2	13	12
	L	2	2	10	8
4	R	1	1	20	13
	L	2	3	15.5	11
5	R	4	4	18	12
	L	3	3	15	13
6	R	3	2	15	13
	L	3	4	17	11
المعدل الحسابي		2.5	2.3	15.6	12.1
سيطرة ممنعة (P.B.S)		0	0	0	0
سيطرة غير ممنعة (Anthraxin)		0	0	0	0

Rو L تمثل جهة الحقن اليمنى واليسرى على التوالي



شكل: 1 مقطع نسجي في جلد أحد الحيوانات الممنعة والمحقونة بالأنثراكسين يبين ارتشاح الخلايا وحيدة النواة وخاصة اللمفية والبلعمية في الأدمة والنسيج تحت الجلد مع الخزب . (H&E X200)



شكل: 2 مقطع نسجي في جلدأحد الحيوانات الطبيعية يبين طبقات الجلد، البشرة والأدمة. (H&E X400)

المناقشة

ارتكزت الدراسة على تحضير مادة الأنثراكسين بطريقة جديدة حسب ما أشار اليه(19)مع بعض التحويرات اليسيرة وهذه المادة عبارة عن خلاصات الجدار الخلوي لجرثومة ال *B.anthracis* عترة ستيرن غير المكونة للمحفظة ،فبعد تحضيرنا لهذه المادة جرى تجربتها على خنازير غينيا محسسة باللقاح البيطري باستخدام فحص فرط الحساسية الجلدي وقد سجلت نتائج جيدة سواء لقطر منطقة الأحمرار أو لفرق تثخن الجلد ، اذ بلغت معدلاتها الحسابية 15.6ملم و 2.5 ملم على التوالي بعد 24 ساعة و 12.1 ملم و 2.3 ملم بعد 48 ساعة مقارنة بمحلول السيطرة (P.B.S) الذي أعطى نتائج سالبة في الحيوانات الممنعة .ولغرض تلافي النتائج الموجبة الكاذبة ،حقنت مادة الأنثراكسين في خنازير غينيا غير ممنعة وكانت النتائج سلبية.

يتكون جدار جرثومة ال *B.anthracis* من الخارج من المحفظة (في حالة العتر الضارية) وعندما تكون غير مكونة للمحفظة فأن طبقة Surface layer (S-layer) (عبارة عن بروتين أو glycoprotein) التي تغطي عدة طبقات من الببتيدات كلايكان تكون مسؤولة عن التركيب النموذجي للجدار (23)؛ اذ تتكون طبقة ال S-layer من بروتينين تتواجد على سطح الجرثومة(24) هما Sap(Surface array protein) و EA1(Extractable antigen 1) (25) ،وأن طبقة متعدد الببتيدات المكونة لل EA1 و Sap ترتبط بأواصر تساهمية مع ببتيدات كلايكان الجدار الخلوي (26).

أشار الباحثون(19) الى أن مادة الأنثراكسين تتكون بصورة رئيسة من معقد من ببتيدات كلايكان ومتعدد السكريدات،وهي لا تحتوي على البروتين وهذا ما قمنا بتأكيده عند قياس تركيز البروتين والسبب في ذلك يعزى الى ترسيب البروتين بحامض الخليك في حين احتوى على نسبة عالية من السكريات بلغت 10.5 ملغم/ديسي لتر،اذ يحتوي متعدد السكريدات لجرثومة الجمرة الخبيثة على مستويات عالية من ال galactose و ال N-acetylglucosamine(27) ترتبط بأواصر تساهمية مع ببتيدات كلايكان الجدار الخلوي ،وأن معقدات الببتيدات كلايكان ومتعدد السكريدات مكونة من أحماض أمينية وسكريات أمينية (amino sugar) متمثلة ب glutamic acid (6.9%;wt/wt)، alanine (6.8%) ، m- (8.9%) diamino pemilic acid ، N-acetylglucosamine (29.7%) ، muramic acid (9.1%) و galactose (24.3%) (28) وهذا ما يفسر القراءات العالية للفحص الجلدي فالقابلية المناعية (Immunogenicity) للمستضد تعتمد على عوامل عدة منها الحجم ودرجة التعقيد (complexity) والقابلية الأنهضامية والشكل وتعرض المحددات المستضدية (Accessibility) ودرجة الغرابة (foreignness) (29).

وكما هو معروف أن اللقاحات الحية المضعفة ومنها لقاح الجمرة الخبيثة البيطري (الذي منعت به حيوانات التجربة) يحفز فضلا عن الأستجابة الخلطية استجابة مناعية خلوية ،فبعد تمنيع الحيوانات باللقاح الحاوي على ألأبواغ الحية فأنها تتحول داخل الجسم الى الطور الخضري ويحصل لها هضم (ingestion) وتهيئة (processing) داخل البلاعم الكبيرة (macrophage) (30) فالخلايا الخضرية غير الحاوية على محفظة تكون حساسة جدا لعملية البلعمة (phagocytosis) والتي لها دور بارز في حث الأستجابة المناعية الخلوية (16) والتي أمكننا كشفها بوساطة الأنثراكسين بأستخدام فحص فرط الحساسية الجلدي من النوع المتأخر.

رغم حقيقة أن كل منتوج جديد يجب مقارنته مع مستضد مرجعي على سبيل المثال مقارنة الأنثراكسين مع المستضد الثابت بالحرارة المستخدم في فحص أ سكولي ولكننا لم نتمكن من اجراء ذلك لعدم توفر الأخير محليا وعدم امكانية انتاجه لكون احدى خطوات تحضيره تتطلب استعمال عترة ضارية لجرثومة الجمرة الخبيثة فهو خلاصة أنسجة مأخوذة من حيوانات نافقة بالمرض. ففي دراسة أجراها (19) عندما قاموا بمقارنة مستضدات مستخلصة من الجدار الخلوي لجرثومة الجمرة الخبيثة عترة ستيرن وهي الأنثراكسين والمستضد الثابت بالحرارة لأسكولي مع المستضد المستخلص البروتيني المنقى جزئيا ومقارنتها من ناحية تحفيز الاستجابة المناعية الخلوية في خنازير غينيا ممنعة باللقاح البيطري وجد أن الأنثراكسين ومستضد أسكولي أعطت نتائجا متماثلة بالفحص الجلدي في حين كانت المعدلات أخفض بكثير في المستضد المستخلص البروتيني.

أوضح الباحثان (28) عندما قاما بتمنيع خمس مجاميع من خنازير غينيا بكل من الجدار الخلوي للجرثومة والمستضد المستخلص المنقى جزئيا وأبواغ عترة ستيرن (اللقاح البيطري) واللقاح البشري الحاوي على المستضد الحامي فضلا عن محلول السيطرة (P.B.S) ،وجد أن أعلى معيار للأجسام المضادة الموجهة ضد متعدد السكريدات كان للمجموعة التي أعطيت الجدار الخلوي هذا دليل على احتوائه على نسبة عالية من متعدد السكريدات .وأشار الباحثان نفسهما أن الأجسام المضادة الخاصة بالمستضد الحامي والعامل القاتل كانت منخفضة جدا في مجموعتي الجدار الخلوي والمستضد المستخلص وهذا يؤكد أن الأنثراكسين الذي حضرناه من الجدار الخلوي لا يحتوي على ذيفان الجرثومة، وعندما أجري اختبار التحدي بعترة Ames الضارية لمجموعتي الجدار الخلوي والمستضد المستخلص لم تصمد أي من حيواناتها رغم امتلاكها مستويات عالية من الأضداد موجهة لمتعدد السكريدات والمستضد البروتيني، ربما لأن هذه المستضدات قد حصلت لها تغطية (masked) بواسطة المحفظة الموجودة بالعترة الضارية، وكما هو معروف أن الأضداد الخاصة بالمستضد الحامي تلعب دورا رئيسا في الحماية من المرض وأن

المستضدات الأخرى أهميتها أقل في هذا الجانب وهذا يعزز حقيقة عدم وجود أي من مكونات الذيفان في تركيب الأنثراكسين.

ولأجل زيادة توضيح التفاعل الجلدي أجري الفحص النسجي لمقاطع جلد أخذت من مناطق حقن الأنثراكسين اذ لوحظ بالفحص المجهري ارتشاح الخلايا الألتهابية ولاسيما الخلايا البلعمية والعدلات في منطقة الأدمة وحول الأوعية الدموية كما شوهد اوديما في طبقة أدمة الجلد واحتقان الأوعية الدموية وتكفيف خلوي حولها وهذا يتفق مع ما أشار اليه Cohen & Ward (31).

وبذلك نكون قد حصلنا على مادة أنثراكسين بمواصفات عالية ولأول مرة في القطر (حضرت من الجدار الخلوي للجرثومة) تسهم في تشخيص مرض الجمرة الخبيثة وتقييم كفاءة لقاحاته في الحيوانات المختبرية مما يفتح الباب لدراسات لاحقة مثل استخدام هذه المادة على مستوى الحيوانات الحقلية والانسان ودراسة طبيعة هذه المادة وتركيبها الكيميائي بالتفصيل.

المصادر

1- Papaparaskevas, J.; Houhoula, D.P.; Papadimitriou, M.; Saroglou, G.; Legakis, N.J. and Zerva, L. (2004). Rulling out *Bacillus anthracis*. Emerg.Infect.Dis. 10(4): 732-735. Available from: .

2- Lew, D. and Garbino, J. (2003).*Bacillus anthracis* (Anthrax) .Curr. Treat. Optin. in Infect. Dis.5:409-418

3-Rao, S. and Taufeeq, A.M. (1979). Cutaneous anthrax in Nineveh governorate. Iraqi Med.J. 27(3&4): 32-40.

4-Vetter, S.M.and Schlievert, P.M. (2005).Glycerol monolaurate inhibits virulence factor production in *Bacillus anthracis*. Antimicrob.Agents Chemother.49 (4):1302-1305.

5-Laforce, F.M. (2001). Clinical features and treatment of anthrax. Available.

6-Buxton, A. and Fraser, G. (1977).Animal Microbiology.Vol.1Black Well Scientific Publications, London. PP: 195-203.

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

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

9- 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. (Abstract).

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

11- Shlyakhov, E.N. and Rubinstein, E. (1994). Human live anthrax vaccine in the former USSR. Vaccine. 12(8): 727-730.

12- Logan, N.A. and Turnbull, P.C.B. (1999). Bacillus and recently derived genera .In: Manual of Clinical Microbiology. Murray, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A.; Tenover, F.C. and Yolken, R.H.Eds.7th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC, and U.S.A. PP: 357-369.

13- (O.I.E.) Office International des Epizooties Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. (2000).Anthrax.4th ed.

14-Turnbull,P.C.B.; Boehm,R. ;Cosivi,O.; Doganay, M.;Hugh-Jones,M.E .;Lalitha ,M.K.and Devos,V.(1998). Guidelines for the Surveillance and Control of Anthrax in Humans and Animals. WHO/EMC/ZDI/98.6. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

15-Quinn,C.P.; Semenova, V.A.;Elie,C.M.; Remero- Steiner,S.;Green, C.; Li, H. ; Stamey ,K.; Steward-Clark, E.; Schmidt, D.S.; Mothershed , E. *etal*. (2002). Specific, sensitive, and quantitative enzyme –linked mmunosorbent assay for human Immunoglobulin G antibodies to anthrax toxin protective antigen. J. Emerg . Infect. Dis. 8(10):1103-1110.

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

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

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

19-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.

20-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.

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

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

23-Todar, K. (2003).The genus *Bacillus* .Todar 's Online Textbook of Bacteriology.

24-Almeida, J.L.; Wang, L.; Morrow, J.W. and Cole, K.D. (2006).Requirements for the Development of *Bacillus anthracis* spore reference material used to test detection systems .J.Res.Natl.Inst.Stand.Technol.111 (3):205-217 .

25-Mignot, T.; Mesnage, S.; Tosi-Couture, E.; Mock, M. and Fouet, A. (2001). A developmentally regulated S-layer switch in *Bacillus anthracis* .In:4th International Conference on Anthrax (2001) .

26-Fouet,A.;Mesnage,S.;Mignot,T.;Tosi-Couture,E. and Mock ,M.(2001).

Bacillus anthracis S-layer: Anchoring and Dynamic.4th International Conference on Anthrax (2001).

27-De, B.K.; Bragg, S.L.; Sanden, G.N.; Wilson, K.E.; Diem, L.A.; Marston, C.K.; Hoffmaster ,A.R. ;Barnett ,G.A.; Weyant ,R.S .; Abshire ,T.G. ; Ezzell , J.W. and Popovic,T. (2002).Two-component direct fluorescent-antibody assay for rapid identification of *Bacillus anthracis* .J.Emerg.Infect.Dis.8(10):1060-1065.

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

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

30-Tizard, I.R. (1987). An Introduction to Veterinary Immunology .3rd W.B. Saunders Company, Philadelphia.

31-Cohen,S. and Ward, P.A.(1971). In vitro and in vivo activity of a lymphocyte and immune complex-dependent chemotactic factor for eosinophils. J.Exp.Med. 133:133-146.