مقارنة المستضدات المحضرة من عصيات الجمرة الخبيثة لغرض استخدامها كعدة تشخيصية للمرض في الحيوانات المختبرية[1]

إنعام جاسم لفتة الجبوري غازي موسى كاظم الخطيب

وحدة الامراض المشتركة– كلية الطب البيطري – جامعة بغداد

الخلاصة

جرى في هذه الدراسة تحضير عدة مستضدات على مختلف الأوساط الزرعية السائلة مثل مرق فول الصويا ووسط نقيع القلب والدماغ وتمثلت الأوساط الصلبة باستخدام وسط أكار نقيع القلب والدماغ ووسط أكار فول الصويا وبطرائق مختلفة وجرت مقارنة المستضدات المحضرة بوساطة الفحص الجلدي بدء بالفحوصات التمهيدية في خنازير غينيا غير ممنعة والتي سجلت نتائج سالبة . أما بخصوص الحيوانات الممنعة باللقاح البيطري للجمرة الخبيثة فقد أجري الفحص الجلدي بعد ثلاثة أسابيع من التمنيع كانت النتائج إيجابية للمستضدات جميعها وسجلت أعلى المعدلات الحسابية للمستضد المخفف 1/40 على وسط أكار نقيع القلب والدماغ بالنسبة لقطر منطقة الاحمرار الذي بلغ معدله 16.38 ملم أما فرق سمك الجلد فكان 3.44 ملم . المستضد السائل على وسط فول الصويا سجل معدل قطر احمرار بلغ 14.14ملم وفرق تثخن 3.43ملم . وكان معدل قطر منطقة الاحمرار للمستضد 1/40على وسط أكار فول الصويا 10.21 ملم وفرق التثخن 2ملم . المستضد السائل على وسط نقيع القلب والدماغ سجل قطر احمرار 9.5 ملم وفرق تثخن 3.02 ملم. بينت الدراسة أن أفضل المستضدات التي يمكن اعتمادها في تشخيص مرض الجمرة الخبيثة وتقييم لقاحاته هو المستضد المستخلص من الوسط الزرعي السائل مرق فول الصويا كذلك المستضدين المخففين 1/40على وسط أكار فول الصويا والمحضر على وسط أكار نقيع القلب والدماغ .

[1] البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول

Comparison Of *Bacillus anthracis* Prepared Used Antigens As Diagnostic kit Of Anthrax In Laboratoy Animals.

Al- Jebouri A.J. Al- Khatib G.M.
Zoonotic disease unite- College of Vet. Med. - Baghdad University

SUMMARY

This study was concerned on the preparation of several antigens on different types of culture media like brain heart infusion, tryptic soy agar and broth. A comparison was carried out among the prepared antigens using skin test in non-vaccinated guinea pigs which showed negative results. Another trials were conducted using sensitized guinea pigs with live attenuated anthrax vaccine. After three weeks of immunization, skin test was conducted and all antigens revealed positive skin reactions. The highest means were recorded by the dilution 1/40 on the brain heart infusion agar with the mean of erythema of 16.38 mm and a difference of thickness 3.44 mm, while on tryptic soy broth the mean of erythema was 14.14 mm and the difference of thickness was 3.43 mm. The mean of erythema and thickness were 10.21 mm and 2 mm subsequently observed on the dilution 1/40 on tryptic soy agar. The antigen gained from brain heart infusion gave a mean of erythema of 9.5 mm and 3.02 mm thickness. The results mentioned above indicated that the best antigens for the diagnosis and evaluation of anthrax vaccines are the antigen prepared on tryptic soy broth and the two diluted antigens as well.

المقدمة

يعد مرض الجمرة الخبيثة من الأمراض المشتركة التي تسببها جرثومة مكونة للأبواغ هي أل *Bacillus anthracis* (1) .الاسم Anthrax مشتق من الكلمة الإغريقية anthrakas والتي تعني الفحم coal بسبب آفة الجلد السوداء التي يسببها المرض والمميزة له(2,3). وهو من الأمراض المهمة تاريخيا (4) وأول مرض تم اكتشافه سببته الجراثيم وكان Koch أول من وصف الجرثومة بالتفصيل سنة 1877 (5,6) .الإشارة الأولى للمرض كانت سنة 3500 قبل الميلاد ويعتقد أن المرض هو المسؤول عن الوبائين الخامس والسادس اللذين حصلا في مصر سنة 1491 قبل الميلاد (7).

سجل المرض لأول مرة في الإنسان عام 1834 وشوهدت عصية الجمرة الخبيثة تحت المجهر من قبل Delafond سنة 1838 ، وثبت كونها مسببا للمرض عام 1868 من قبل Davaine (8) . في

سنة 1877 استطاع العالم Koch تنمية الجرثومة في مزرعة نقية وأظهر قابليتها على تكوين أبواغ داخلية (Endospores) وأحدث المرض تجريبيا بحقنها في الحيوانات وبذلك وضع كوخ فرضيته الشهيرة Koch 's Postulate (9) وفي نفس هذا الوقت ميز John Bell مرض مصنفي الصوف (Wool Sorter 's Disease)أو مرض الجمرة الخبيثة الاستنشاقي (10) .

هذا المرض كان أول مرض جرثومي صنعت له لقاحات حية من قبل لويس باستور سنة 1881 (11) . اكتسب المرض عدة تسميات فضلا عن مرض الجمرة الخبيثة منها : الآفة السوداء (Black Bane) ، مرض براد فورد (Bradford Disease) ، مرض البثرات الخبيثة (Malignant Carbuncle) ومرض (Rag Picker Disease) ، طاعون سيبر يا (Siberian Plague) ، مرض مصنفي الصوف ، وعدة تسميات مماثلة بلغات أخرى (12) .

يعد هذا المرض من الأمراض المتوطنة في عدد من المناطق الزراعية في العالم لاسيما الشرق الأوسط وأجزاء من آسيا وأفريقيا (13) ، ومن المناطق التي يتوطن فيها هذا المرض هي قطرنا العراقي وإيران وتركيا وباكستان وبعض مناطق الصحراء الأفريقية (14)ويعد المرض مهما في قطرنا كونه يسبب خسائر اقتصادية في قطعان الماشية فضلا عن تأثيره على الصحة العامة من جهة أخرى (15) .

يتميز المرض بأعراضه غير الواضحة والتي غالبا ما تكون الموت المفاجئ في الحيوانات بدون علامات سابقة(16) . ومن هنا ظهرت أهمية وضرورة التشخيص المبكر للمرض إذ أن الإصابة الحادة للمرض لا يمكن تشخيصها بشكل يعول عليه بالفحوصات المصلية لأن الأجسام المضادة الخاصة بالمرض تظهر في المراحل المتأخرة منه ويمكن أن تختفي في الحالات المعالجة . لذا استخدم فحص الأنثراكسين الجلدي (Anthraxin skin test) كبديل للاختبارات التأكيدية للكشف عن الاستجابة المناعية الخلوية المتكونة ضد المرض وهذا يخدم في التشخيص المبكر للحالات الحادة للمرض فضلا عن تشخيص الحالات القديمة Retrospective Diagnosis (17,18) .

المواد وطرائق العمل

العتر الجرثومية

العترة اللقاحية :- جرى الحصول عليها من لقاح الجمرة الخبيثة والمنتج من شركة الكندي لإنتاج اللقاحات والأدوية البيطرية والحاوي على أبواغ عترة ستيرن غير الضارية لجرثومة الجمرة الخبيثة والذي يستعمل محليا لتحصين الحيوانات ضد المرض .

عترة ستيرن :- (Sterne strain 34 F2) وهي عترة مضعفة لعصية الجمرة الخبيثة منزوعة المحفظة تم الحصول عليها من شركة الكندي بشكل مجفد(Lyophilized) .

الحيوانات المختبرية

جرى استعمال خنازير غينيا بالغة بأعمار متقاربة ذكورا وإناثا (عددها 16 من ضمنها 4 سيطرة) والتي تم الحصول عليها من شركة الكندي ، تراوحت أوزانها بين 350-250غم .

تحضير المستضدات

1- المستضد المخفف 1/40على وسط أكار فول الصويا

- زرعت الجرثومة المنشطة على مرق نقيع القلب والدماغ وحضنت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37°م .
- تم فحص النمو الجرثومي بتحضير شريحة زجاجية وصبغها بصبغة كرام كذلك إجراء فحص الحركة للتأكد من نقاوته.
- أخذ 2مل من الوسط الزرعي السابق وأضيف إلى سطح الوسط الزرعي في كل طبق من أطباق وسط أكار فول الصويا مع تحريك الأطباق لكي تتوزع هذه الكمية بصورة متساوية على سطحها وترك الوسط ليجف وبعدها وضعت الأطباق في الحاضنة بدرجة 37°م لمدة 48ساعة .
- حصدت الجراثيم بوساطة الناشر (Spreader) باستعمال 5مل من محلول دارئ الفوسفات الملحي المعقم لكل طبق وبعدها وضعت في دورق معقم .
- غسل الحاصل الجرثومي ثلاث مرات باستخدام دارئ الفوسفات الملحي المعقم باستعمال المنبذة المبردة بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 15دقيقة كل مرة وأهمل السائل الطافي .
- جمع الراسب وتم حله بكمية مناسبة من دارئ الفوسفات الملحي المعقم 5مل ووضع في قنينة زجاجية صغيرة ورج جيدا لكي يتجانس .
- وضع الراسب في الموصدة تحت ضغط 15باوند /أنج ^{2} وبدرجة حرارة 121°م لمدة 15 دقيقة .
- خفف هذا المستضد 1/40باستعمال دارئ الفوسفات الملحي المعقم .

2-المستضد المخفف 1/40 على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب

حضر هذا المستضد بنفس خطوات تحضير المستضد السابق ما عدا استخدام وسط نقيع القلب والدماغ الصلب بدلا من وسط أكار فول الصويا .

3-المستضد السائل على وسط مرق نقيع القلب والدماغ

- زرعت الجرثومة على وسط نقيع القلب والدماغ السائل لمدة 24 ساعة بدرجة 37°م وذلك بأخذ 2 مل من مستنبت سابق عمره 48ساعة وإضافته إلى 200 مل من هذا الوسط .
- بعد التأكد من نقاوة النمو من خلال إجراء صبغة كرام وفحص الحركة ، قتلت الجرثومة بالموصدة بدرجة حرارة 121°م تحت ضغط 15باوند /أنج ^{2} ولمدة 15 دقيقة .
- تم الترشيح باستخدام مرشح نبيذ قياس 0.22 ما يكرون .
- أجريت عملية تركيز (Prevaporation) للراشح باستعمال أنبوبة ديلزة إذ ترك معلقا في الغرفة في أجواء باردة (شهر كانون الثاني) وتمت مراقبته لمدة ثلاثة أيام إلى أن وصل حجم المحلول النهائي إلى 50 مل (من أصل 200 مل) لغرض تركيز المستضد إلى ربع حجمه .
- جمع المستضد في النهاية في قنان نظيفة ومعقمة وحفظ في الثلاجة بدرجة 4° م لحين استعماله.

4-المستضد السائل على وسط مرق فول الصويا

- جرى زرع الجرثومة على وسط مرق فول الصويا وحضنت بدرجة 37° م لمدة 48 ساعة وذلك بإضافة 2 مل من زرع سابق(نمي لمدة 24ساعة) إلى 200 مل من وسط مرق فول الصويا .
- تم فحص المستنبت للتأكد من خلوه من الملوثات وذلك بعمل شريحة زجاجية وصبغها بصبغة كرام كذلك أجري اختبار الحركة .
- قتلت الجرثومة بفعل الحرارة بدرجة 121° م وضغط 15 باوند /أنج ^{2} لمدة 15 دقيقة بوساطة الموصدة .
- تم الترشيح باستخدام مرشحة زايتز وأهمل المستنبت .
- وضع الراشح في أنبوبة ديلزة وعلق في الغرفة لبرودة الجو(في شهر شباط) وجرى مراقبته لأربعة أيام إلى أن وصل إلى الحجم المطلوب (50مل من أصل 200 مل) وذلك لغرض تركيزه إلى ربع حجمه .
- جمع المستضد الناتج في قنان معقمة وحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال .

التمنيع

- منعت خنازير غينيا(عددها 12) بإعطائها لقاح الجمرة الخبيثة المنتج محليا بجرعة 0.5 مل / حيوان تحت الجلد وبعد مرور أربعة عشر يوما أعطيت الجرعة الثانية(19) .
- حيوانات السيطرة (عددها 4) المستخدمة في الفحوصات التمهيدية لم تدخل برنامج التمنيع .

الفحص الجلدي

أجري فحص الحساسية الجلدي للمستضدات المختلفة بعد أن تم تحضير منطقة الخاصرة وذلك بقص وحلاقة الشعر وتعقيم المنطقة بالكحول وقد تم اختيار الحيوانات ذات الخاصرة البيضاء لسهولة القراءة وبعد ذلك تم تحديد منطقة الحقن برسم دائرة لكل مستضد وجرى قياس سمك الجلد الطبيعي لكل دائرة وبعدها حقنت المستضدات داخل الأدمة(I/d) بحجم 0.1 مل لكل مستضد باستعمال محقنة نبيذه (انسولين) سعة 1مل وإبرة ذات معيار 26 مع حقن دارئ الفوسفات الملحي المعقم كسيطرة ، ثم قيس التفاعل الناتج من حقن المستضدات خلال 24 و 48 ساعة من حيث احمرار منطقة الحقن وتصلبها (زيادة سمكها) بوساطة المسطرة المعدنية المنزلقة (20) .

النتائج

1-الفحوصات التمهيدية في حيوانات سيطرة غير ممنعة :-

من خلال متابعة الحيوانات غير الممنعة والمحقونة بالمستضدات المحضرة سواء المستضد المخفف 1/40 بنوعيه أو المستضد السائل بنوعيه لم تسجل أي زيادة في قطر منطقة الاحمرار وفرق سمك الجلد بعد 24 و 48 ساعة من الحقن .

2- نتائج الفحص الجلدي للحيوانات الممنعة والمحقونة بالمستضدات المختلفة بعد ثلاثة أسابيع من التمنيع :- تبين الجداول 1 و 2 و 3 و4 نتائج الفحص الجلدي للمستضدات ومحلول دارئ الفوسفات الملحي المعقم المستخدم كسيطرة في الحيوانات الممنعة والتي تؤشر أعلى المعدلات الحسابية بالنسبة لقطر منطقة الاحمرار وفرق سمك الجلد كانت للمستضد المخفف 1/40 على وسط نقيع القلب والدماغ يليه المستضد السائل على وسط مرق فول الصويا الذي سجل معدلات أقل منه بقليل ثم المستضد 1/40 على وسط أكار فول الصويا والمستضد السائل على وسط نقيع القلب والدماغ اللذين سجلا معدلات حسابية أقل نسبيا كما هو موضح في الشكل (1).

جدول (1) :الفحص الجلدي للمستضد المخفف 1/40 المحضر على وسط أكار نقيع القلب والدماغ

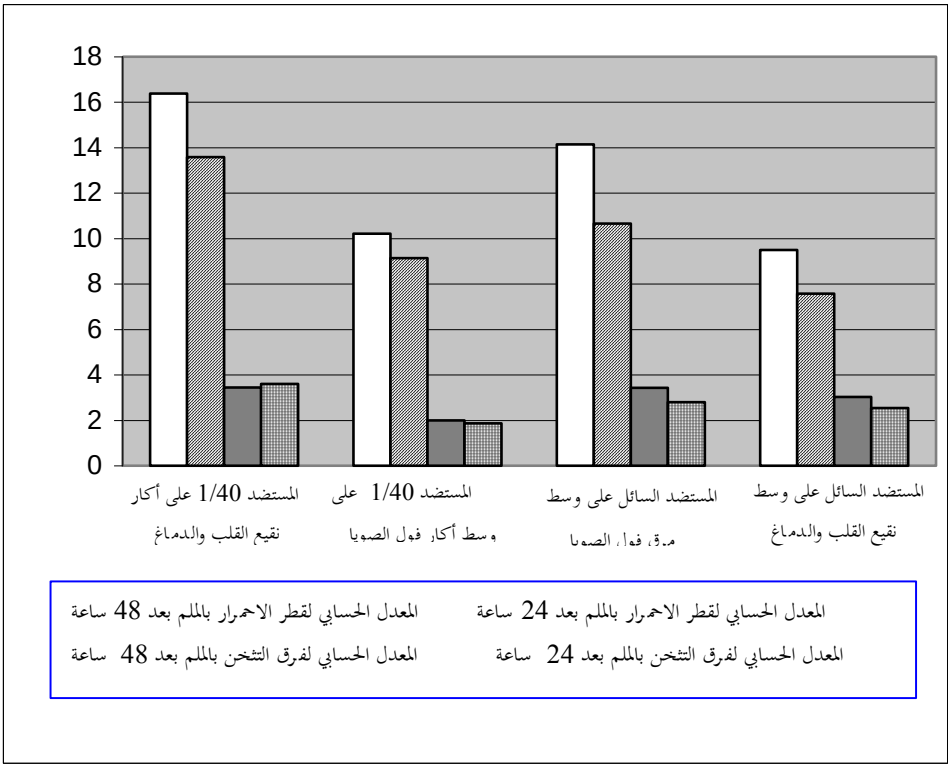
رقم الحيوان	قطر منطقة الاحمرار/ملم		فرق سمك الجلد /ملم	
	بعد 24ساعة	بعد 48ساعة	بعد 24ساعة	بعد 48ساعة
1	17.1	10.4	2.6	3.2
2	15.7	16.9	2.7	3.7
3	14.9	14.4	2.9	1.5
4	17.7	12.1	3.9	3.9
5	16.5	14.1	5.1	5.7
المعدل الحسابي	16.38	13.58	3.44	3.6
P.B.Sحيوان سيطرة ممنع	-	-	-	-
حيوان سيطرة غير ممنع	-	-	-	-

جدول (2): الفحص الجلدي للمستضد المخفف 1/40 على وسط أكار فول الصويا

رقم الحيوان	قطر منطقة الاحمرار/ملم		فرق سمك الجلد /ملم	
	ساعة 24بعد	ساعة 48بعد	ساعة 24بعد	ساعة 48بعد
1	10	6	1	2
2	11	17	1.5	2
3	13	8	3.3	2
4	9	9	3	2
5	11	9	2.5	2.5
6	9	6.5	1.25	1
7	8	8.5	1.5	1.5
المعدل الحسابي	10.21	9.14	2	1.86
حيوان سيطرة ممنع P.B.S	-	-	-	-
حيوان سيطرة غير ممنع	-	-	-	-

جدول (3) :الفحص الجلدي للمستضد السائل على وسط مرق فول الصويا

رقم الحيوان	قطر منطقة الاحمرار/ملم		فرق سمك الجلد /ملم	
	بعد 24ساعة	بعد 48ساعة	بعد 24ساعة	بعد 48ساعة
1	9.5	12.2	3.7	2.6
2	22.1	10.2	2.95	1.45
3	9.4	9	2.1	2.2
4	13.5	8.6	3.5	3.8
5	16.2	13.3	4.9	3.9
المعدل الحسابي	14.14	10.66	3.43	2.79
حيوان سيطرة ممنع P.B.S	-	-	-	-
حيوان سيطرة غير ممنع	-	-	-	-



شكل (1): يبين المعدلات الحسابية لقطر منطقة الاحمرار وفرق سمك الجلد بعد 24 و 48 ساعة

جدول (4):الفحص الجلدي للمستضد السائل على وسط نقيع القلب والدماغ

رقم الحيوان	قطر منطقة الاحمرار/ملم		فرق سمك الجلد /ملم	
	بعد 24ساعة	بعد 48ساعة	بعد 24ساعة	بعد 48ساعة
1	12	7	1.5	2.5
2	8.5	11.5	2	2
3	13	8.5	3	1.5
4	10	9	3	2
5	7	5	4.65	3.25
6	7	5	4	3.5
7	9	7	3	3
المعدل الحسابي	9.5	7.57	3.02	2.54
حيوان سيطرة ممنع P.B.S	-	-	-	-
حيوان سيطرة غير ممنع	-	-	-	-

المناقشة

مرض الجمرة الخبيثة من الأمراض الواسعة الانتشار في العالم وتعد الحيوانات مصدرا رئيسيا لإصابة الإنسان(21) .لقد ازدادت خطورته في السنوات الأخيرة إذ أصبح مرضا مهما بالنسبة للصحة العامة نتيجة لاستخدام الجرثومة كعامل من عوامل الحرب البيولوجية (22). في هذه الدراسة جرى تحضير نوعين من المستضدات بصورة عامة مستضدان سائلان استخدم في تحضيرهما وسط مرق نقيع القلب والدماغ ووسط مرق فول الصويا ومستضدان مخففان 1/40 جرى تحضيرهما على وسطي أكار فول الصويا وأكار نقيع القلب والدماغ. كان الغاية منها هو الحصول على مستضدات الجرثومة الثابتة بالحرارة المتكونة من متعدد السكريدات ، بروتين ، والحوامض النووية .

ومن أجل المقارنة بين هذه المستضدات باستخدام فحص الحساسية الجلدي من النوع المتأخر (DTH) قمنا بإجراء فحوصات تمهيدية في خنازير غينيا غير محسسة مسبقا لأجل معرفة أي من المستضدات يعطي نتائجا موجبة كاذبة لغرض استبعادها وأيها لا يعطي لغرض استخدامها فيما بعد

بالتجارب اللاحقة وجميع المستضدات أعطت نتائجا سلبية بالفحص الجلدي سواء كان في قطر منطقة الاحمرار أو فرق سمك الجلد .

أما بالنسبة للتجارب التي أجريت في حيوانات ممنعة فقد عمدنا إلى تمنيع الحيوانات بجرعتين بينهما مدة أربعة عشر يوما وذلك لأجل زيادة توضيح التفاعل الجلدي وتجنب النتائج غير الواضحة إذ بين الباحثان (23) أن أفضل حماية (Protection) يمكن الحصول عليها عند استخدام جرعتين تمنيعية من الأبواغ الحية لعترة ستيرن بينهما مدة أربعة عشر يوما .

أجري الفحص الجلدي بعد مرور ثلاثة أسابيع من الجرعة الثانية وقد سجل المستضد المخفف 1/40 على وسط أكار نقيع القلب والدماغ أعلى المعدلات الحسابية من حيث قطر الاحمرار وفرق سمك الجلد ، أما المستضد السائل على مرق فول الصويا فقد سجل بالفحص الجلدي نتائجا مقاربة له كذلك الحال بالنسبة للمستضد 1/40 على وسط أكار فول الصويا .في حين سجل المستضد السائل على وسط نقيع القلب والدماغ أقل المعدلات الحسابية . يعزى حدوث الاحمرار في الجلد إلى تحرر العوامل الفعالة وعائيا (vasoactive factors) من الخلايا الصارية(mast cells) مؤدية إلى توسع الأوعية الدموية(vasodilatation) وبالتالي حصول الاحمرار (24) .أما سبب التثخن فيعود إلى تجمع أعداد كبيرة من الخلايا اذ تقوم خلايا T المحسسة بالمستضد بالانقسام والتمايز وتحرر المدورات اللمفاوية التي تلعب دورا مهما في تفاعلات DTH مثل العامل الجاذب للبلاعم الكبيرة (Macrophage Chemotactic Factor) والعامل الذي يمنع هجرة البلاعم الكبيرة Migration Inhibitory Factor (الانترفيرون كاما) التي تجلب البلاعم الكبيرة الى منطقة الحقن (25) .

إن المعدلات الحسابية للاختبار الجلدي كانت مرتفعة في الاسبوع الثالث من التمنيع ، اذ ذكر الباحثون (26) و (27) أن اللقاح البيطري (Veterinary Live Anthrax Vaccine VLAV) الذي استخدمناه في هذه الدراسة كذلك الحال بالنسبة للقاح البشري الحي المستخدم ضد الجمرة الخبيثة والذي يدعى HLAV (Human Live Anthrax Vaccine) يعدان مستضدان عاليا الجودة أي أنهما يحفزان كلا من المناعة الخلوية والخلطية، فبعد تمنيع المضيف ضد هذا المرض فأن الاستجابة المناعية الأولية تتمثل بحصول البلعمة (Phagocytosis) لعصيات اللقاح التي تكون منزوعة المحفظة لذا فأنها حساسة جدا لعملية البلعمة بوساطة البلاعم الكبيرة وهذه العملية تصل ذروتها خلال 2– 3 أسابيع من التمنيع وهذا ما يفسر أو يعكس القراءات العالية للفحص الجلدي بعد ثلاثة أسابيع من التمنيع (28) .
بعد كل ما تقدم أثمرت الدراسة عن إيجاد مستضدات تشخيصية كاشفة لإصابات الجمرة الخبيثة سواء كانت المبكرة أو القديمة وهي المستضد السائل على وسط مرق فول الصويا والمستضد المخفف 1/40 بنوعيه المحضر على وسط أكار فول الصويا والمحضر على وسط أكار نقيع القلب والدماغ والتي يمكن

استخدامها لقياس مستوى الاستجابة المناعية الخلوية المتكونة كرد فعل مناعي للإصابة أو للتمنيع بلقاح الجمرة الخبيثة وذلك لتقييم اللقاحات البيطرية أو البشرية لحد ما فضلا عن المسوحات الوبائية ولا سيما أن قطرنا يعد من البلدان المتوطنة بهذا المرض لذلك نوصي باستخدام هذه المستضدات لما أظهرته من نتائج جيدة في فحص الحساسية الجلدي من النوع المتأخر .

المصادر

1. 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.Available 2-Tilton, D. (2001). Anthrax: What 's the big deal.
2. Inglesby, T.V.; Tool, T.O.; Henderson, D.A.; Bartlett, J.G.; Ascher, M.S.; Eitzen, E.; Friedlander, A.M.; Gerberding, J.; Hauer, J.; Me Dade, J.; Osterholm, M.T.; Parker, G.; Perl, T.M.; Russeil, P.K. and Tonat, K. (2002). Anthrax as a biological weapon, updated recommendations for management. JAMA. 287(17): 2236-2252.
3. Logan, N.A. (1988). Bacillus species of medical and veterinary importance.J.Med.Microbiol.25 (3): 157-165.
4. Lamanna, C. (1967). The anthrax question. Federation Proc.26: 1491-1492.
5. Todar, K. (2001). *Bacillus anthracis* and anthrax. Bacteriology 330 Home Page.
6. Shafazand, S.; Doyle, R.; Ruoss, S.; Weinacker, A. and Raffin, T.A. (1999). Inhalational anthrax: epidemiology, diagnosis and management. Chest.116: 1369-1376.
7. Klemm, D.M. and Klemm, W.R. (1959). A history of anthrax.J.A.V.M.A. 135(9): 458- 462.
8. Ryan, K.J. and Falkow, S. (1994). *Corynebacteria*, *Listeria*, *Bacillus*, and other aerobic and facultative gram- positive rods .In: Sherris Medical Microbiology. Ryan, K.J. Ed.3 rd ed. Appleton and Lange, U.S.A. PP: 285-294.
9. Cranmer, H. and Martinez, M. (2001). CBRNE- Anthrax infection. E Medicine Journal. 2(10).
10. Cieslak, T.J.and Eitzen, E.M. (1999). Clinical and epidemiologic principles of anthrax. Emerg. Infect. Dis. 5 (4): 552-555

11. Quinn, C.P. and Turnbull, P.C.B. (1998). Anthrax. In: Topley and Wilson 's Microbiology and Microbial Infections. Collier, L.; Balows, A. and Sussman, M. Eds. 9th ed.Vol.3.Arnold, Oxford University Press, Inc., London, UK. PP: 799-818.

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

13. Laforce, F.M. (2001). Clinical features and treatment of anthrax..

14. Al-Dabbas, A.H. AND Sharma, G.L. (1981). An epizootic of cutaneous anthrax in donkeys, horses, cattle and buffaloes in southern Iraq. Indian Vet. J. 58:1-9.

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

16. 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).

17. Migueles, S.A.and Tuazon, C.U. (2001). Anthrax in the new Millennium. Current Treatment Opinions in Infectious Diseases. 3:247-258.

18. 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.

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

20. Van Ness, J.B. (1971). Ecology of anthrax. Science. 172:1303-1307.

21. 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.

22. 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.

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

24. Tizard, I.R. (1977). An Introduction to Veterinary Immunology.2 nd ed.W.B.Saunders Company, Philadelphia.

25. 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.

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

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