

ANTHRAX AŞILAMALARINDAN SONRA OLUŞAN BAĞIŞIKLIK ANTİKORLARININ İNDİREKT MİKROHEMAGLUTİNASYON METODU İLE TESPİTİ

Musa YÜRÜSÜN (*) Mübeccel YUMUŞAK (**)

GİRİŞ

Bütün dünyada insanlar ve hayvanlar arasında yaygın bir enfeksiyon olan şarbon, alınan ciddi önlemler sayesinde gelişmiş ülkelerde son 20 yıldan beri nadiren görülmektedir. Fakat yurdumuzda hâlâ çok yaygın olarak bulunan bir hastalıktır. Bu bakımdan bu hastalığın eradike edilmesi için daha ciddi çalışmalara ihtiyaç vardır. Yurdumuzda Max-Sterne metodu ile hazırlanan avirulent kapsülsüz sporlu anthrax aşısı üretilmektedir. Bu aşının bağışıklık denemeleri ise koyunlarda eprüvasyon metodu kullanılmak suretiyle yapılmaktadır. Bu deneme için anthrax'a karşı aşılanmamış koyunlar kullanılmaktadır. Ancak bağışıklık denemelerinden önce bu hayvanlarda bağışık antikor bulunup bulunmadığı tespit edilememektedir. Bu nedenle aşı üretimi esnasında zaman zaman eprüvasyona dirençli hayvanların meydana çıkması denemelerden olumlu sonuç alınamamasına neden olmaktadır. Böyle hallerde denemenin tekrarı zaman ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Bunun için anthrax aşısı üretimi esnasında yapılan eprüvasyon metodu uygulanacak hayvanların bağışık antikor taşıyıp taşımadıklarını tespit veya bu metodun yerini alabilecek bir serolojik metodun ortaya çıkarılabilmesi ve iyi çalışan metodla anthrax aşısı ile aşılanmış değişik bölgelerde ve zamanlarda hayvanların bağışık durumlarının tesbitine ihtiyaç duyulduğundan bu çalışma ele alınmıştır (4).

(*) Etilik Hay. Hast. Arşt. Ens. Anthrax Lab. Şefi

(**) » » » » » » Uzman Vet. Hekim

MATERYAL VE METOT

Denemelerimizde yetiştirme laboratuvarına gelen koyun kan serumlarını materyal olarak kullandık.

Besiyeri : Avirulan, kapsülsüz 34 F₂ sterne suşu Wright ve arkadaşları (10) tarafından geliştirilen 1095 vasatında üretildi.

Testte Kullanılan Tampon Solusyonlar

1 — Phosphate buffer solusyonu (PBS) pH: 7,2 (3)

Na ₂ HPO ₄	286 ml.	0,15 M
KH ₂ PO ₄	90 ml.	0,15 M
NaCl	376 ml.	0,15 M

2 — Alsever Solusyonu (1)

Dextrose	2,05 gm.
Sodium Citrate	0,8 gm.
Sodium Chloride	0,42 gm.
Distile su	100 cc.

pH'sı, % sitrik asit solusyonu ile pH: 6,1'e ayarlanır.

3 — Tannic asit (3)

1/100'lük izotonik tuzlu suyla dilisyonu yapılarak + 4°C kahverengi şişelerde saklandı.

30 günden sonraki dilisyonlar kullanılmadı.

4 — Normal Tavşan Serumı (3)

Normal tavşan serumu immünize edilmemiş tavşanlardan elde edildi. 56°C'de 30 dakika ısıtarak komplementi inaktive edildi. Bu serum izotonik tuzlu su ile 1/100 dilue edilerek —20°C'de saklandı. Günlük olarak kullanılacağı zaman 1/200'lük dilisyonu hazırlandı.

Besiyerinin Hazırlanması :

Bu besiyeri için amino asitler ve kimyasal maddeler hassas terazide tartıldı. Glukoz ve sodyum bikarbonat ayrı ayrı otoklav edilerek ana solusyona katıldı.

Glutamik asit, Phyridoxal HCl ve Ferrous sülfate ayrı ayrı filtre edildi ve daha önce otoklav edilmiş ana solusyona katıldı (7, 10).

Suşun besiyerine ekilmesi :

34 F₂ suşu iki tüp buyyona ekildi. Buradan 24 saat sonra 1095 besiyerine pasaj yapıldı. 45 saat inkubasyondan sonra 1.500 derecede santrifüj edilerek süpernatant sıvı alındı. Bu sıvı sefadex G-25' ten süzülerek -20°C'de saklandı, antijen olarak kullanıldı (2, 7, 10).

Tavşanlarda antiserum hazırlanması :

Tavşanlar önce normal anthrax aşısı ile aşılandı (0,5 cc. deri-altı). 3 hafta sonra hazırlanan antijen kulak venasından 0,5 cc. verildi. Her seferinde 0,5 cc. artırılarak 5 gün arayla tekrarlandı. 1 hafta sonra kesilip kanları alınarak serumları çıkarıldı. + 4°C'de saklandı. Pozitif serum olarak kullanıldı.

Negatif serumlar :

Anthrax aşısının bağışıklık denemelerinde kullanılan koyunlardan deneme öncesinde alınan serumlar negatif serum olarak kullanıldı.

Eritrositlerin tannik asitle muamelesi :

Denemelerimde kullanılan kan (eritrosit), enstitümüze ait olan koyunlardan, steril alsever solusyonu içinde alınmıştır. Koyun eritrositleri 1/15.000'lik tannic asitle eşit hacimde karıştırılıp 37°C'de 10 dakika inkube edildi. Bu süre sonunda santrifüj edilerek tannik asit atıldı (2, 5).

Tannik asitli eritrositlerin antijenle duyarlılaştırılması :

Santrifüjden sonra dipteki 0,1 ml. eritrosit hazırladığımız 0,5 ml. (1/2) antijenle karıştırıldı. Karışım 37°C'de su banyosunda 15 dakika tutulduktan sonra santrifüj edilerek üstteki kısım atıldı. Dipteki tortu 1/250 normal tavşan serumu içeren pH 7,2 fosfat buffer ile % 2 sulandırıldı (2).

Reaksiyonun yapılışı :

a — Serumlar 56°C'de 30 dakika inaktive edildi.

b — Mikropleyt çukurlarına önce 0,25 ml. 1/100 normal tavşan serumu ihtiva eden pH 7,2 fosfat buffer kondu.

Birinci çukura 0,25 serum kondu, bu ileriye doğru dilüc edildi. (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64).

c — Her çukura 0,25 ml. duyarlılaştırılmış % 2 eritrosit süspan-siyonundan kondu. Hafifçe çalkalandı. Oda derecesinde 2 saat inkube edildi (2.)

B U L G U L A R

Koyun kan serumlarında indirekt mikrohemaglutinasyon testiyle anthrax'a karşı yapılan bağışıklık deneme sonuçları tabloda gösterilmiştir. Buna göre 266 koyun kan serumu reaksiyona sokulmuş, bu test sonucu 2 katlı artırarak dilüe edilen serumlar 1/2 - 1/64 arası değişik oranlarda titrasyonlar göstermiştir. 11 serum negatif, 31 serum 1/2, 85 serum 1/4, 82 serum 1/8, 35 serum 1/16, 13 serum 1/32, 9 serum 1/64'e kadar çalışmıştır. Pozitif serum olarak tavşanlardan hazırlanan antiserumların 1/64 titreye sahip olduğu görülmüştür. (Tablo I, II).

TABLO : I
ANTHRAX INDIRECT MICROHEMAGGLUTINATION TEST SONUÇLARI
D İ L Ü S Y O N L A R

Serum No.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
1	++++	++++	++++	+++	—	—
2	++++	++++	++++	—	—	—
3	++++	++++	++++	—	—	—
4	++++	++++	+++	—	—	—
5	++++	++++	++++	++	—	—
6	++++	+++	++	—	—	—
7	++++	++++	++++	+++	—	—
8	++++	+++	++	—	—	—
9	—	—	—	—	—	—
10	++++	—	—	—	—	—
11	++++	+++	++	—	—	—
12	++++	++++	++++	—	—	—
13	++++	++++	++++	—	—	—
14	++++	—	—	—	—	—
15	++++	++++	—	—	—	—
16	—	—	—	—	—	—
17	++++	++	—	—	—	—
18	++++	++++	++++	—	—	—
19	++++	++++	++++	—	—	—
20	++++	++	—	—	—	—
21	++++	—	—	—	—	—
22	++++	++	—	—	—	—
23	++++	++++	++++	++	—	—
24	++++	++++	++	—	—	—
25	++++	++++	++++	—	—	—
26	++++	++++	++++	+++	++	—
27	++++	++++	++++	—	—	—
28	++++	++++	++++	—	—	—
29	++++	++++	++++	++++	—	—
30	++++	++++	++++	—	—	—
31	++++	—	—	—	—	—
32	++++	++++	++++	—	—	—
33	++++	++++	++++	++++	++++	—
34	++++	++++	++++	—	—	—
35	++++	—	—	—	—	—
36	++++	++++	++++	++	—	—
37	++++	++++	—	—	—	—
38	++++	++	—	—	—	—
39	++++	++++	++++	++++	++++	++
40	++++	++	—	—	—	—

Anthrax aşılama ları - Yürüsün - Yumuşak

Serum No.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
41	++++	—	—	—	—	—
42	++++	+++	++	—	—	—
43	++++	++	—	—	—	—
44	++++	++++	++	—	—	—
45	++++	+++	—	—	—	—
46	++++	++	—	—	—	—
47	++++	++++	—	—	—	—
48	++++	++++	—	—	—	—
49	++++	++	—	—	—	—
50	++++	++++	++	—	—	—
51	++++	++++	++++	++	—	—
52	++++	++++	++++	—	—	—
53	++++	++++	++	—	—	—
54	++++	++++	—	—	—	—
55	++++	++++	++++	—	—	—
56	++++	++++	++++	—	—	—
57	++++	++++	++++	—	—	—
58	++++	++++	++++	—	—	—
59	++++	++++	++++	++++	—	—
60	++++	++++	—	—	—	—
61	—	—	—	—	—	—
62	++++	++	—	—	—	—
63	++++	++++	++++	—	—	—
64	++++	++	—	—	—	—
65	++++	++++	++	—	—	—
66	+	+	—	—	—	—
67	++++	++++	++	—	—	—
68	++++	++++	++	—	—	—
69	++++	++++	++++	++++	++++	++++
70	++++	++++	++	—	—	—
71	—	—	—	—	—	—
72	++++	++++	++++	—	—	—
73	++++	++++	++++	—	—	—
74	++++	++++	+++	—	—	—
75	++++	++++	—	—	—	—
76	++++	++	—	—	—	—
77	++++	++++	+++	—	—	—
78	++++	++++	++++	—	—	—
79	++++	+++	—	—	—	—
80	++++	++++	++++	—	—	—
81	++++	++++	++++	—	—	—
82	++++	++++	++++	++	—	—
83	++++	++	—	—	—	—
84	++++	++++	++++	+++	—	—
85	++++	++++	—	—	—	—

Serum No.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
86	++++	—	—	—	—	—
87	++++	++++	—	—	—	—
88	++++	++	—	—	—	—
89	++++	++++	++++	—	—	—
90	++++	++++	++++	—	—	—
91	++++	+++	—	—	—	—
92	++++	+++	—	—	—	—
93	++++	++	—	—	—	—
94	++++	++	—	—	—	—
95	++++	++++	—	—	—	—
96	++++	++++	—	—	—	—
97	++++	++++	++++	—	—	—
98	++++	++	—	—	—	—
99	++++	++++	++++	—	—	—
100	++++	++++	++++	—	—	—
101	++++	++++	—	—	—	—
102	++++	++	—	—	—	—
103	++++	++	—	—	—	—
104	++++	++	—	—	—	—
105	++++	+++	—	—	—	—
106	++++	—	—	—	—	—
107	++++	++++	—	—	—	—
108	++++	++++	—	—	—	—
109	++++	+++	++	—	—	—
110	++++	++	—	—	—	—
111	++++	++++	—	—	—	—
112	++++	++++	—	—	—	—
113	++++	+++	—	—	—	—
114	++++	++++	+++	—	—	—
115	—	—	—	—	—	—
116	++++	++++	—	—	—	—
117	++++	—	—	—	—	—
118	++++	++++	+++	—	—	—
119	++++	++++	—	—	—	—
120	++++	++++	—	—	—	—
121	++++	++++	—	—	—	—
122	++++	++++	++++	—	—	—
123	++++	++++	—	—	—	—
124	++++	++++	++	—	—	—
125	++++	++++	—	—	—	—
126	++++	++++	++++	—	—	—
127	++++	+++	—	—	—	—
128	++++	++++	+++	—	—	—
129	—	—	—	—	—	—

Anthrax aşılama ları - Yürüsün - Yumuşak

Serum No.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
130	++++	++++	+++	—	—	—
131	++++	++++	+++	—	—	—
132	++++	+++	—	—	—	—
133	++++	++	—	—	—	—
134	++++	++++	+++	—	—	—
135	++++	++++	—	—	—	—
136	++++	++++	++++	++++	—	—
137	++++	+	—	—	—	—
138	++++	++++	—	—	—	—
139	++++	++++	++++	++++	—	—
140	++++	—	—	—	—	—
141	++++	++++	++++	+++	—	—
142	++++	++++	—	—	—	—
143	++++	—	—	—	—	—
144	++++	++++	++++	++++	—	—
145	++++	++++	—	—	—	—
146	++++	++++	++++	+++	++	—
147	++++	++++	—	—	—	—
148	++++	—	—	—	—	—
149	++++	++++	+++	—	—	—
150	++++	++++	+++	—	—	—
151	++++	+	—	—	—	—
152	++++	+++	++	—	—	—
153	++++	++	—	—	—	—
154	++++	—	—	—	—	—
155	++++	+++	—	—	—	—
156	++++	—	—	—	—	—
157	++++	++++	+++	—	—	—
158	—	—	—	—	—	—
159	++++	—	—	—	—	—
160	++++	+++	+++	—	—	—
161	++++	++++	—	—	—	—
162	++++	—	—	—	—	—
163	++++	+++	+++	—	—	—
164	—	—	—	—	—	—
165	++++	++++	++++	++++	—	—
166	++++	—	—	—	—	—
167	++++	++++	++++	++++	—	—
168	++++	++++	—	—	—	—
169	++++	++++	++++	++++	++++	+++
170	++++	++++	++++	+++	—	—
171	++++	++++	++++	++++	++	—
172	++++	+++	—	—	—	—

Serum No.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
173	++++	++++	++++	++	—	—
174	++++	—	—	—	—	—
175	++++	++++	++++	++++	++	—
176	++++	—	—	—	—	—
177	—	—	—	—	—	—
178	++++	+++	—	—	—	—
179	++++	++++	++	—	—	—
180	++++	++++	—	—	—	—
181	++++	++++	+++	—	—	—
182	++++	++++	++++	++++	++	—
183	++++	+++	++	—	—	—
184	++++	++++	+++	++	—	—
185	++++	++++	—	—	—	—
186	++++	++++	++++	++++	+++	++
187	++++	++++	+++	++	—	—
188	++++	++++	++	—	—	—
189	—	—	—	—	—	—
190	++++	++++	++++	+++	—	—
191	++++	++++	—	—	—	—
192	++++	+++	++	—	—	—
193	++++	—	—	—	—	—
194	++++	++++	++++	+++	—	—
195	++++	++++	—	—	—	—
196	++++	++++	+++	—	—	—
197	++++	—	—	—	—	—
198	++++	++++	+++	++	—	—
199	++++	—	—	—	—	—
200	++++	++++	++	—	—	—
201	++++	++++	++++	++++	++++	+++
202	++++	++++	—	—	—	—
203	++++	++++	++++	+++	++	—
204	++++	++++	—	—	—	—
205	++++	+++	++	—	—	—
206	++++	++++	++++	+++	—	—
207	++++	++++	—	—	—	—
208	++++	++++	+++	—	—	—
209	++++	++++	++++	++	—	—
210	++++	++++	—	—	—	—
211	++++	++++	++++	+++	+++	++
212	++++	++++	++++	++	—	—
213	++++	+++	++	—	—	—
214	++++	+	—	—	—	—
215	++++	++++	++++	++++	++	—

Anthrax aşılımları - Yürüsün - Yumuşak

Serum No.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
216	+++	—	—	—	—	—
217	++++	+	—	—	—	—
218	++++	++++	++++	—	—	—
219	—	—	—	—	—	—
220	++++	++++	++++	++++	++	—
221	++++	++++	+++	—	—	—
222	++++	++++	++++	+++	—	—
223	++++	+++	+++	—	—	—
224	++++	++++	+++	—	—	—
225	++++	+++	+++	—	—	—
226	++++	+++	—	—	—	—
227	++++	—	—	—	—	—
228	++++	+++	++	+	—	—
229	++++	++++	++++	++++	++	+
230	++++	++++	++	—	—	—
231	++++	++++	—	—	—	—
232	++++	++++	++++	+++	++	—
233	—	—	—	—	—	—
234	++++	++++	+++	++	—	—
235	++++	++++	+	—	—	—
236	++++	+++	—	—	—	—
237	++++	+++	++	++	—	—
238	++++	+++	++	—	—	—
239	++++	++	—	—	—	—
240	++++	++++	+++	++	+	—
241	++++	—	—	—	—	—
242	++++	++++	+++	+	—	—
243	++++	++++	+++	++	—	—
244	++++	+++	—	—	—	—
245	++++	++++	++++	++++	++	+
246	++++	++++	++++	+++	++	+
247	++++	+++	+	—	—	—
248	++++	++++	++	—	—	—
249	++++	—	—	—	—	—
250	++++	++++	—	—	—	—
251	++++	—	—	—	—	—
252	++++	—	—	—	—	—
253	++++	+++	—	—	—	—
254	++++	++++	++	—	—	—
255	++++	—	—	—	—	—
256	++++	+++	—	—	—	—
257	++++	—	—	—	—	—
258	++++	++	—	—	—	—

Serum No.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
259	++++	++	—	—	—	—
260	++++	++++	+++	—	—	—
261	++++	++	—	—	—	—
262	++++	+++	+	—	—	—
263	++++	—	—	—	—	—
264	++++	++++	+++	++	+	—
265	++++	—	—	—	—	—
266	++++	++++	++++	++	—	—
Pozitif Kontrol Serum	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Negatif Kontrol Serum	—	—	—	—	—	—

TABLO : II
ANTHRAX INDIRECT MICROHEMAGGLUTINATION TEST SONUÇLARI

D İ L Ü S Y O N L A R

Serumlar	Negatif	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
11 serum	X						
31 serum		X					
85 serum			X				
82 serum				X			
35 serum					X		
13 serum						X	
9 serum							X

TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünyanın birçok ülkelerinde üretilen anthrax aşılarının bağışıklık denemelerinde eprüvasyon metodu uygulanmaktadır. Yurdumuzda üretilen anthrax aşısının bağışıklık denemeleri Sterne'nin (8) tarif ettiği şekilde gerek kobaylarda ve gerekse koyunlarda eprüvasyon metodu uygulanarak yapılmaktadır. Bu metodun yerine geçebilecek veya aşılammamış hayvanlardaki bağışıklık durumunu saptamak üzere serolojik metodlar üzerinde bazı çalışmalar yapılmıştır.

Ouchterlony (6) anthrax infeksiyonu geçiren veya bağışık kılan hayvanlarda, bağışıklık durumunu saptamak üzere agar presipitin inhibisyon testi üzerinde çalışmalarını sürdürmüş ve daha sonra Thorne ve Belton (9) B.Anthracisin bağışık antikorunun titrasyonu için agar-jel diffuzyon testinin metodunu ve antijen üretimi için kullandıkları değiştirilmiş 599 ve casamino asit vasatlarını tarif etmişler ve olumlu sonuç almışlardır. Bizde Wright ve arkadaşlarının (10) geliştirdikleri 1095 besiyerini kullandık ve olumlu sonuç aldık. Ancak 1095 besiyerinde hazırladığımız antijeni çalışmalarımızda 1/2 sulandırmayla başarılı olabildik. Ayrıca Buchanan ve arkadaşlarının (2) tarif ettiği şekilde antijen hazırlanmasında Sephadex G-50 column chromatography yerine Sephadex G-25 column chromatographisi kullanıldı. Eritrositlerin duyarlılaştırmasında ise 1/15000'lik tannik asit teste alındı.

Buchanan ve arkadaşlarının 0,025'e ayarladıkları mikropipetleri biz 0,25 ml.'e ayarlayarak çalıştık. Yine Buchanan ve ark. (2) yaptıkları bir çalışmada IMH testinin agarjel diffuzyon ve CF testinden daha duyarlı olduğunu saptamışlardır. Fakat testte kullanılan % 2'lik duyarlılaştırılmış eritrositlerin 2 günde bir tazelenmesi gerektiği için ve RBC (Red Blood Cells) antigen süspansiyonunun kısa ömürlü olduğundan dolayı bu testin yapılmasının güçlüğü ortaya konmuştur. Fakat diğer testlere nazaran daha çabuk ve bir günde çok serum işlenmesi bakımından bu testin daha kullanışlı olduğunu savunmuşlardır.

Sonuç olarak anthrax'a karşı bağışık antikorların meydana çıkarılmasında en iyi metodun eprüvasyon metodu olduğu ve buna paralel olarak IMH testinin yapılmasının olumlu olacağı kanısındayız.

Ö Z E T

Anthrax aşısının bağışıklık kontrolünde eprüvasyona alınan hayvanların antikor taşıyıp taşımadıklarını saptamak amacıyla bu çalışma yapıldı.

Toplam olarak 266 koyun kan serumu IMH testi ile yoklandı.

Buna göre 11 serum negatif, 31 serum 1/2, 85 serum 1/4, 82 serum 1/8, 35 serum 1/16, 13 serum 1/32, 9 serum 1/64'e kadar çalıştı.

S U M M A R Y

Determination of antibodies produced after anthrax vaccination by using indirect microhaemagglutination method.

Our purpose in this study was the fixation whether the sheep challenged had antibodies in the immunity control of anthrax vaccine.

Totally 266 sheep blood sera were examined by IMH test.

As a result of this study 11 sera were negative, 31 sera of 1/2, 85 sera of 1/4, 82 sera of 1/8, 35 sera of 1/16, 13 sera of 1/32, 9 sera of 1/64 dilutions worked as pozitif reaction.

KAYNAKLAR

- 1 — BOYDEN, S.V. (1950) : The adsorption of proteins on Erythrocytes Treated With Tannic acid and subsequent Hemagglutination By Antiprotein Sera. Journal Exp. Med. 93. 107-120.
- 2 — BUCHANAN, T.M. (1971) : Anthrax Indirect Micro Hemagglutination Test. The journal of immunology. Vol. 107. 1631-1636.
- 3 — DANIEL, T.M., WEGAND, J.G.M., JR and STAVITSKY, A.B. (1962) : Micro-methods for the study of proteins and antibodies. J. Immun. Vol. 90. 741-750.
- 4 — EMRE, M.N. and BULU, A.A. (1981) : Agar Jel Diffusion ve CF testi ile anthrax'a karşı bağışık antikorların tespiti. Doğa Bilim Dergisi. Vet. Hay. Tar. Orm. Cilt 5.
- 5 — JOHNSON, A. and WINEGAR. (1984) : Comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent and Indirect Hemagglutination Assays for Determining Anthrax Antibodies. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 20. No: 3. 357-360.
- 6 — OUCHTERLONY, O. (1953) : Antigen-Antibody Reactions in Gels. IV. Types of Reactions in Coordinated Systems of Diffusion. Acta Path Microbiol scand, 32, 231-254.
- 7 — PUZISS, M. and WRIGHT, G.G. (1954) : Studies on immunity in anthrax. IV. Factors Influencing Elaboration of the Protective Antigen of Bacillus Anthrax in Chemically Defined Media. Journal of Bacteriology. Vol. 68. 474 - 482.
- 8 — STERNE, M. (1946) : Avirulent Anthrax Vaccines Onderst. J. Vet. Sci., 21, 41-44.
- 9 — THORNE, C.B., BELTON, F.C. (1957) : An agar Diffusion Method for Titrating, B. Anthracis Immunizing. Antigen and its Application to a study of antigen production. J. Gen. Microbiol. 17, 505-516.
- 10 — WRIGHT, G.G., PUZISS, M., and MEELY, B.W. (1961) : Studies on immunity in anthrax, IX. Effect of Variations on Elaboration of Protective antigen by strains of bacillus anthracis. Journal of Bacteriology. 1962. Vol. 83, 515-522.