

Experimental study of heat-killed oocysts of *Cryptosporidium Parvum* in Balb/ c Mice

Mohammed S. Khudhair^{1*}; Nabeel E.S. Al-Niaeemi²

¹ The Directorate General of Education Nineveh, Mosul, Iraq

² Department of Biology, College of Education for Pure Science, University of Mosul, Mosul, Iraq

Email: ^{1*} ddm432@yahoo.com, ² nabeel.e.s@gmail.com

(Received May 02, 2019; Accepted December 24, 2019; Available online June 01, 2020)

DOI: [10.33899/edusj.2020.165305](https://doi.org/10.33899/edusj.2020.165305), © 2020, College of Education for Pure Science, University of Mosul.

This is an open access article under the CC BY 4.0 license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract

The present study investigated the possibility of infecting *Mus musculus* mice, experimentally, with cryptosporidiosis by inoculation with *Cryptosporidium parvum* oocysts, after treatment with temperatures (70 °C) and non-treated oocysts, single or double doses, aiming at enrichment of information related to existence of oocysts infected, outside the body of the host when subjected to temperatures. Criteria taken into consideration are the period spent by the parasite inside the body of the host, number of oocytes shed by the parasite with the host's stool, total and differential leukocyte count. The Results of the present study shows:

- 1- Shedding of Oocysts started at the 4th day post infection by non-treated Oocysts, at single dose, and continued until the day 35 post infection, whereas with the challenge dose it continued until the 17th day post infection.
- 2- Temperature at (70C⁰) killed the Oocysts as infection of mice didn't occur.
- 3- Generally, a gradual increase in total and differential leukocyte count on infection with non-treated Oocysts at day 3 post infection.

Keywords: *Cryptosporidium parvum*, leukocyte, infected oocysts.

دراسة تجريبية لأكياس بيض طفيلي البويغيات الخبيثة *Cryptosporidium parvum* المقتولة بالحرارة
في الفئران البيض

محمد صالح خضير^{1*} و نبييل عناد صالح²

^{1*} المديرية العامة لتربية نينوى, الموصل, العراق

² قسم علوم الحياة, كلية التربية للعلوم الصرفة, جامعة الموصل, الموصل, العراق

الخلاصة

أشارت هذه الدراسة إلى إحداث الإصابة بداء البويغيات الخبيثة Cryptosporidiosis تجريبياً في الفئران البيض نوع *Mus musculus* وذلك من خلال تجريبيها بأكياس بيض الطفيل *Cryptosporidium parvum* بعد قتلها بتعريضها إلى درجة حرارة (70°C) ومجموعة أخرى غير معاملة، وأجريت التجربة بإعطاء جرعة واحدة أو جرعتين من أكياس بيض طفيل البويغيات الخبيثة *Cryptosporidium parvum* بهدف إغناء المعلومات حول إمكانية بقاء أكياس بيض الطفيلي خمجة خارج جسم المضيف بعد تعرضها إلى درجة حرارة (70°C)، وتم من خلال هذه الدراسة الأخذ بنظر الاعتبار فترة بقاء الطفيلي في جسم المضيف، وكذلك تم حساب عدد أكياس البيض المطروحة في براز المضيف والتعداد الكلي والتفريقي لكريات الدم. بينت الدراسة الحالية النتائج التالية :

1- بدأ طرح أكياس البيض في اليوم الرابع بعد احداث الإصابة باكياس بيض غير معاملة، جرعة واحدة، مستمرة لغاية اليوم الخامس والثلاثين من احداث الإصابة، في حين استمرت العملية لغاية اليوم السابع عشر بعد احداث الإصابة الثانية.

2- درجة الحرارة (70°C) قتلت أكياس البيض بدليل عدم احداثها إصابة في الفئران البيض .

3- لوحظ، بصورة عامة، حدوث ارتفاع تدريجي في التعداد الكلي والتفريقي لكريات الدم البيض عند احداث إصابة، باكياس بيض غير معاملة منذ اليوم الثالث بعد احداث الإصابة.

الكلمات المفتاحية : داء البويغيات الخبيثة، كريات الدم البيض، أكياس بيض الطفيلي خمجة.

المقدمة

داء البويغيات الخبيثة Cryptosporidiosis هو من الامراض المشتركة بين الإنسان والحيوان Zoonotic diseases المنتشرة في العالم [1] والمسبب المرضي لهذا الداء هو طفيل أولي داخل خلوي-خارج سايتوبلازمي Intracellular-extracytoplasmic يعود لجنس البويغيات الخبيثة Genus *Cryptosporidium* وهو واحد من 300 جنس يضم 4800 نوع يقع ضمن شعبة المعقدات القمية Phylum: Apicomplexa. [2,3]. وبسبب متانة أكياس بيض هذا الطفيل فهو يعد من مسببات الامراض التي يمكن ان تنتقل مع الماء والغذاء إلى الإنسان والحيوان معا [2]. ركزت الدراسات، منذ اكتشاف دور الطفيل في إحداث المرض في الإنسان والحيوان على تشخيص الأنواع المختلفة التي تتبع جنس البويغيات الخبيثة ودراسة تأثيرها المرضي وتشخيص الطفيل بالطرق المختلفة وعلاج المرض، ولاتزال الدراسات مستمرة في المجالات المذكورة آنفاً، إلا انه ومنذ منتصف التسعينات تقريباً بدأت الدراسات تتجه نحو تأثيرات البيئة في بقاء ومقاومة أكياس البيض خمجة بعد تعرضها لظروف البيئة المختلفة من رطوبة وجفاف التربة ودرجات الحرارة، التي يمكن ان تتعرض لها هذه التربة بمدى واسع يتراوح بين درجات حرارة أقل من الصفر وأعلى من درجة حرارة 50 °م. وحيث ان التغيير في درجات حرارة البيئة في مناطق مختلفة من العراق يكون بمدى واسع، حيث أخذت هذه النقطة بنظر الاعتبار، وأصبحت دراسة تأثير درجة الحرارة العالية (70°C) على خمجية أكياس البيض لهذا الطفيل من الضرورات لتحديد وبائيته.

من هنا جاء هدف الدراسة الحالية وهو تعريض أكياس بيض الطفيل لدرجة حرارة 70°C لمعرفة مدى إمكانية احتفاظ أكياس البيض بخصوبتها بعد تعريضها لهذه الدرجة الحرارية، وقد اختيرت الفئران السويسرية البيضاء نوع *Mus musculus* نموذجاً لإحداث الإصابة التجريبية فيها.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات

تم جمع 103 عينة غائط من أطفال بعمر يتراوح بين 45 يوماً و 8 سنوات ومن كلا الجنسين (66 ذكور، 37 إناث) من الأطفال الذين يعانون من التهاب المعدة والأمعاء المسبب للإسهال ومن الراقدين في مستشفى السلام العام ومستشفى ابن الاثير في الموصل، حيث تم إعطاء ذوي الأطفال قناني بلاستيكية نظيفة ومرقمة لجميع العينات مدون عليها عمر كل طفل وجنسه، وحفظت العينات في 2.5% من محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم Potassium dichromate (المحضر بإذابة 25 غم من ثنائي كرومات البوتاسيوم في لتر ماء مقطر) حيث اضيف إلى كل حجم من عينة الغائط حجامان من محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم [4]، وتم حفظ العينات في الثلاجة بدرجة حرارة 4°C [5].

فحص عينات الغائط

فحصت عينات الغائط للكشف عن وجود أكياس بيض طفيل *C. parvum* باستخدام طريقة المسحات المصبوغة بصبغة الزيل نلسن المحورة الباردة Modified Zeihl Neelsen stain أو ما يسمى بالصبغة الصامدة للحامض Acid fast stain [6]، مع تغيير وقت الصبغة من 30 دقيقة إلى 5 دقائق بناء على ملاحظات الشرائح المصبوغة، بعد ذلك تم حفظ العينات الحاوية على أكياس بيض الطفيل بمحلول دايكرومات البوتاسيوم ووضعت في الثلاجة لحين استخدامها في الدراسة التجريبية [7].

طرح أكياس البيض:

تم تشخيص أكياس البيض اعتماداً على Deluol [8].

الدراسة التجريبية

الحيوانات المختبرية

استخدمت 105 من الفئران المختبرية السويسرية البيضاء Swiss Albino Mice نوع *Mus musculus* ، سلالة Balb/c و 5 فئران كمجموعة سيطرة، تم الحصول عليها من بيت الفئران الموجود في وحدة البحوث / كلية التربية / قسم علوم الحياة في جامعة الموصل. وتم تربية الفئران في أقفاص بلاستيكية نظيفة ومعقمة وتكثيرها تحت ظروف ملائمة من حيث الحرارة وتوفير الغذاء المكون من عليقة من الحبوب وفول الصويا وبروتين، وبمعدل 5 فئران / قفص تحت ظروف مسيطر عليها قبل إجراء التجارب وبواقع فأرة واحدة / قفص بعد إجراء التجارب. وفحصت عينات من براز الفئران يومياً لمدة أسبوع قبل استخدامها في التجارب للتأكد من خلوها من الإصابة باي طفيل ومن ضمنها *C. parvum* .

تحضير الجرعات من غائط الأطفال وإصابة الفئران

حضرت الجرعات الخمجة من أكياس بيض طفيل *C. parvum* المعزولة من براز الاطفال المصابين بداء البويغيات

الخبئية بالاعتماد على طريقة Freir-Santos *et al* [9] الأتية:

- رشحت العينات الموجبة الحاوية على أكياس بيض الطفيل خلال 4 طبقات من الشاش وأخذ الراشح.
- غسلت عينات البراز المرشحة والمحفوطة في محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم عدة مرات بالماء المقطر وباستعمال جهاز المنبذة بسرعة 700 دورة/دقيقة ولمدة 5 دقائق لحين الحصول على عينة نقية، وفي كل مرة سكب الراشح وأعيد رج الراسب بالماء المقطر.
- طوفت العينة باستخدام المحلول السكري المشبع ذي الكثافة النوعية 1.27 (المحضر من 500 غم سكر، 320 مل ماء مقطر، 6.5 مل فينول) بسرعة 500 دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة [10].
- جمع 20% من الجزء الطافي الحاوي على عدد كبير من أكياس البيض في أنابيب اختبار ذوات نهاية مخروطية مدببة.
- غسل الجزء الطافي بمحلول دارى الفوسفات المتعادل (PBS) Phosphate buffer saline (pH7.2) (المحضر بإذابة 0.144 غم KH_2PO_4 ، 0.795 غم Na_2HPO_4 ، 9 غم NaCl في 1000 مل ماء مقطر) لعدة مرات للتخلص من المحلول السكري.
- اجريت خطوات العزل عند درجة $4^{\circ}C$ للحفاظ على أكياس البيض من التحطم. وبعد كل عملية فصل أخذت قطرة من الراسب على الشريحة الزجاجية ووضع عليها غطاء الشريحة وفحصت تحت المجهر بقوة 100X للتأكد من وجود أكياس بيض الطفيل.

حساب الجرعة الخمجة لأكياس البيض

تم في هذه المرحلة معرفة أعداد أكياس البيض الموجودة في 1 مل من العينة بعد ان اجريت عليها خطوات العزل، إذ استخدم لهذا الغرض مقياس عد خلايا الدم (Hemocytometer) [7] وتم حساب أعداد هذه الأكياس من المعادلة الآتية: [9]

$$N = S/2 \times 1000 \text{ (oocysts / ml of sample).}$$

$$N = \text{number of oocysts in 1 ml of sample.}$$

$$S = \text{number of oocysts in 2 cubic area.}$$

إصابة الحيوانات المختبرية

جرعت الفئران المستخدمة في الدراسة بعمر 3-4 اسابيع، بأوزان متقاربة من الجنسين، عن طريق الفم باستخدام الأنبوب المعدي Stomach tube بجرعة تحتوي على 3×10^4 كيس بيضة لكل فأرة [11,12]. فحص البراز للفئران المصابة يومياً للتأكد من حدوث الإصابة وذلك عند ظهور الأكياس في البراز باستخدام طريقة الفحص المباشر للبراز [13,14].

المجموعة الأولى:

استخدم في هذه المجموعة 35 فأراً اعطيت أكياس بيض غير معاملة (غير معاملة) عن طريق الفم بجرعة 3×10^4 جرعة واحدة فقط، وعزلت 20 فأرة استخدمت بأربعة مجاميع كما يأتي، 15 فأرة قسمت على ثلاث مجاميع (كل مجموعة ضمت 5 فئران) حسب فترات سحب الدم (3 أيام، 15 يوماً و 30 يوماً) بعد إحداث الإصابة، وتم فحص براز الفئران المصابة يومياً اعتباراً من اليوم الأول بعد إحداث الإصابة لمتابعة ظهور أكياس البيض في البراز وتسجيل عددها [13,14].

المجموعة الثانية

ضمت هذه المجموعة 35 فأراً ايضاً أحدثت فيها الإصابة بجرعتين بين جرعة واخرى 30 يوماً، احتوت الجرعة الأولى على أكياس بيض غير معاملة والثانية على أكياس بيض مقتولة بالحرارة.

المجموعة الثالثة

ضمت هذه المجموعة 35 فأراً ايضاً عوملت كما في المجموعة الثانية عدا أن الجرعة الأولى كانت أكياس بيض مقتولة بالحرارة، في حين كانت الجرعة الثانية أكياس بيض غير معاملة.

المعايير المستخدمة في الدراسة

معدل عدد أكياس البيض المطروحة

فحص براز الفئران التي أحدثت فيها الإصابة يومياً اعتباراً من اليوم الأول بعد إحداث الإصابة الأولى أو الثانية لتقدير عدد الأكياس المطروحة في عشرة حقول مجهرية اختيرت عشوائياً لحين اختفاء ظهور الأكياس في البراز وحسب المعدل لثلاثة مكررات.

صورة الدم

بعد تخدير الفئران بالايثر Diethyl ether تم سحب الدم من زاوية العين باتجاه الظفيرة الوريدية خلف مقلة العين بواسطة أنبوب شعري حسب طريقة [15] Waynforth. جمع الدم في أنابيب سعة 1 مل حاوية على مانع التخثر (EDTA) لغرض حساب التعداد الكلي والتفاضلي لكريات الدم البيض Total and Differential Leukocyte Count كما يأتي:

Total Leukocyte Count

التعداد الكلي لكريات الدم البيض

تم حساب الكريات البيض حسب الطريقة المذكورة [16] وأخذ المعدل لثلاثة مكررات.

Differential Leukocyte Count

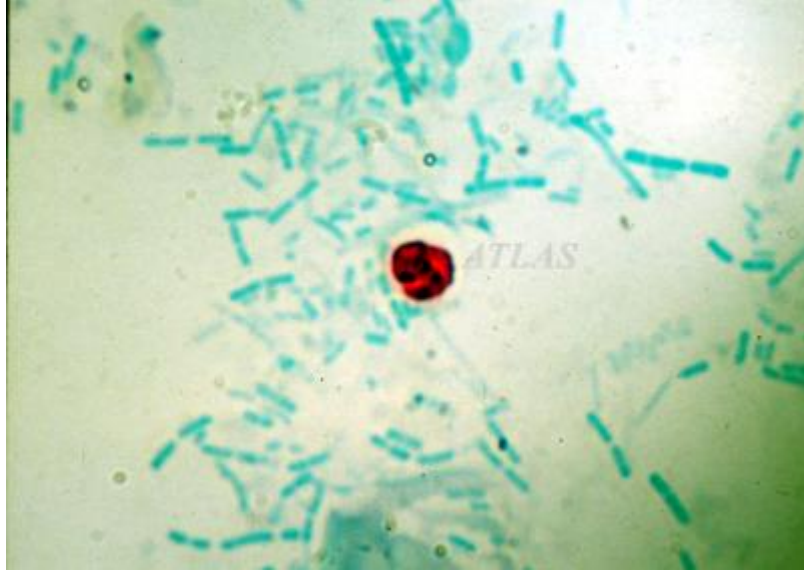
التعداد التفاضلي لكريات الدم البيض

تم تحضير مسحات رقيقة من الدم لغرض حساب العد التفاضلي لكريات الدم البيض وصبغت بصبغة لشمان ، إذ تم عد 100 خلية بيضاء بأنواعها (الحمضات، و وحيدات النواة، واللمفيات والعدلات) في كل شريحة وحساب النسبة المئوية لكل نوع [17].

Statistical Analysis

التحليل الاحصائي

حللت النتائج إحصائياً باستخدام التصميم العشوائي الكامل (CRD) Complete Randomized Design باستخدام اختبار دنكن المتعدد المدى Duncan's Multiple Range Test ، واختبار t (t-test) لإيجاد مستوى الفروقات بين المعدلات عند مستوى معنوي (P≤0.05) [18].

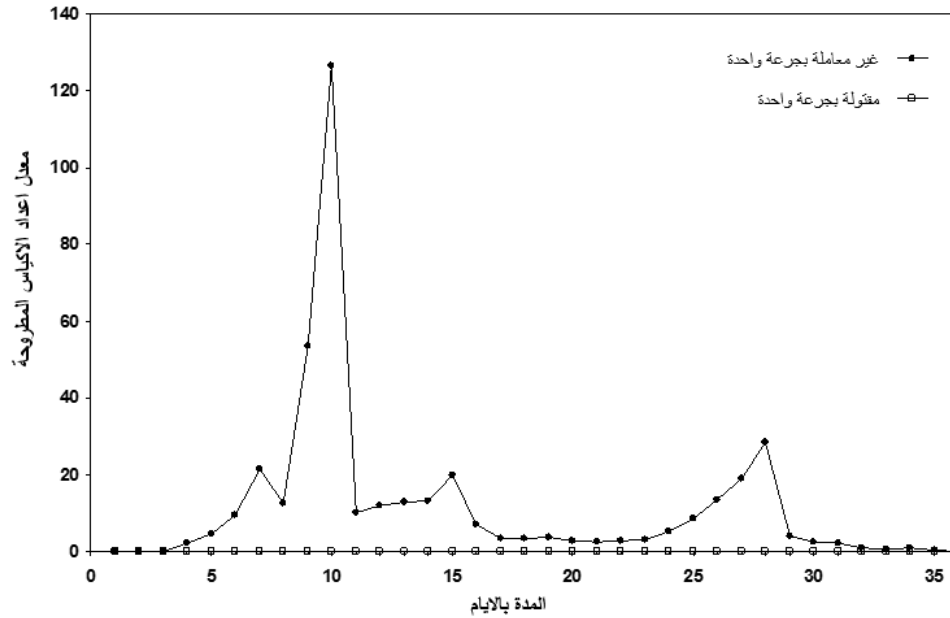


صورة (1) توضح كيس بيض البويغيات الخبيثة في براز الفئران البيض (1000X)

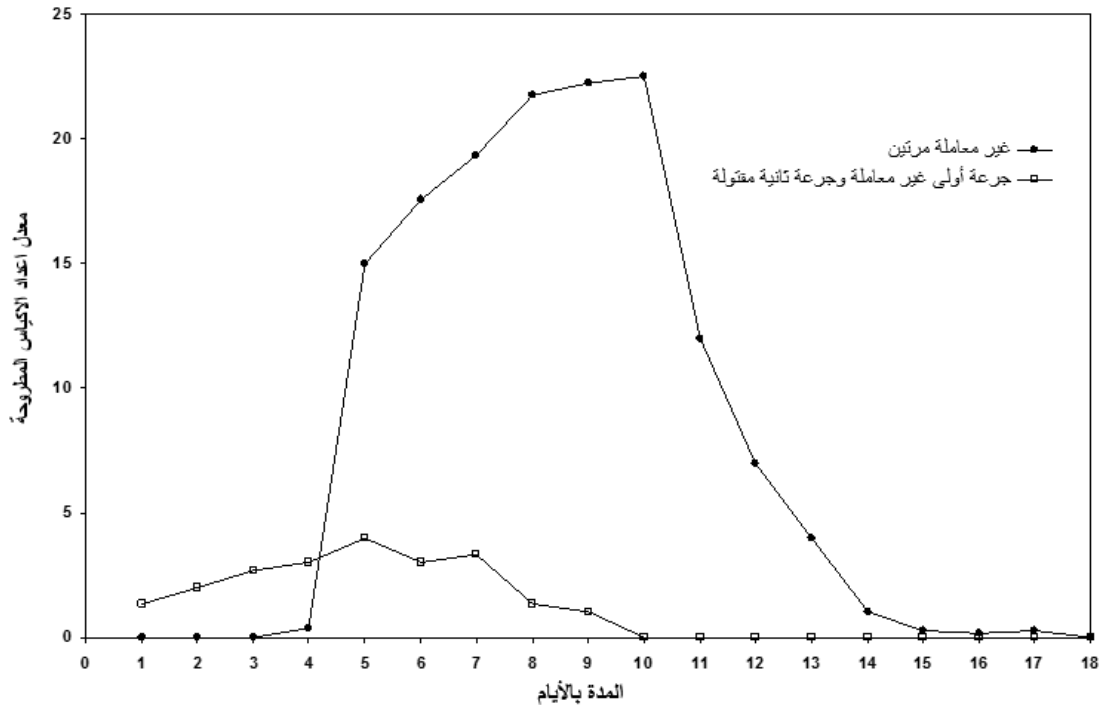
أوضحت الدراسة أن معدلات أعداد أكياس البيض المطروحة مع براز الفئران المصابة، تجريبياً، بأكياس بيض الطفيل غير المعاملة والمقتولة بالحرارة لجرعة واحدة وجرعتين. يتضح من هذه النتائج أن الفئران المجرعة بجرعة واحدة بدأت بطرح أكياس البيض اعتباراً من اليوم الرابع بعد إحداهن الإصابة واستمرت بطرح الأكياس لأوقات مختلفة حسب طبيعة الجرعة، إذ استمر الطرح لغاية اليوم الخامس والثلاثين بعد إحداهن الإصابة بأكياس البيض غير المعاملة، ووصل العدد ذروته في اليوم العاشر بعد إحداهن الإصابة. ولم تلاحظ أكياس البيض في براز الفئران المصابة بأكياس بيض مقتولة بالحرارة (شكل 1).

وبالنسبة للفئران المجرعة بأكياس بيض غير معاملة في الجرعة الأولى ومقتولة بالحرارة في الجرعة الثانية بدأت بطرح أكياس البيض بأوقات مختلفة بعد إحداهن الإصابة واستمرت بطرح الأكياس أيضاً لأوقات مختلفة حسب طبيعة الجرعة، فالفئران المجرعة بأكياس بيض غير معاملة بجرعتين بدأت بطرح أكياس البيض اعتباراً من اليوم الرابع بعد إحداهن الإصابة الثانية، واستمر طرح الأكياس لغاية اليوم السابع عشر بعد إحداهن الإصابة، ووصل العدد ذروته عند اليوم العاشر بعد إحداهن الإصابة الثانية. أما الفئران المجرعة بأكياس بيض غير معاملة في الجرعة الأولى ومقتولة بالحرارة في الجرعة الثانية، فقد بدأت بطرح أكياس البيض اعتباراً من اليوم الأول بعد إحداهن الإصابة الثانية، واستمر طرح الأكياس لغاية اليوم التاسع، ووصل معدل طرح الأكياس ذروته عند اليوم الخامس بعد إحداهن الإصابة الثانية، كما في الشكل (2).

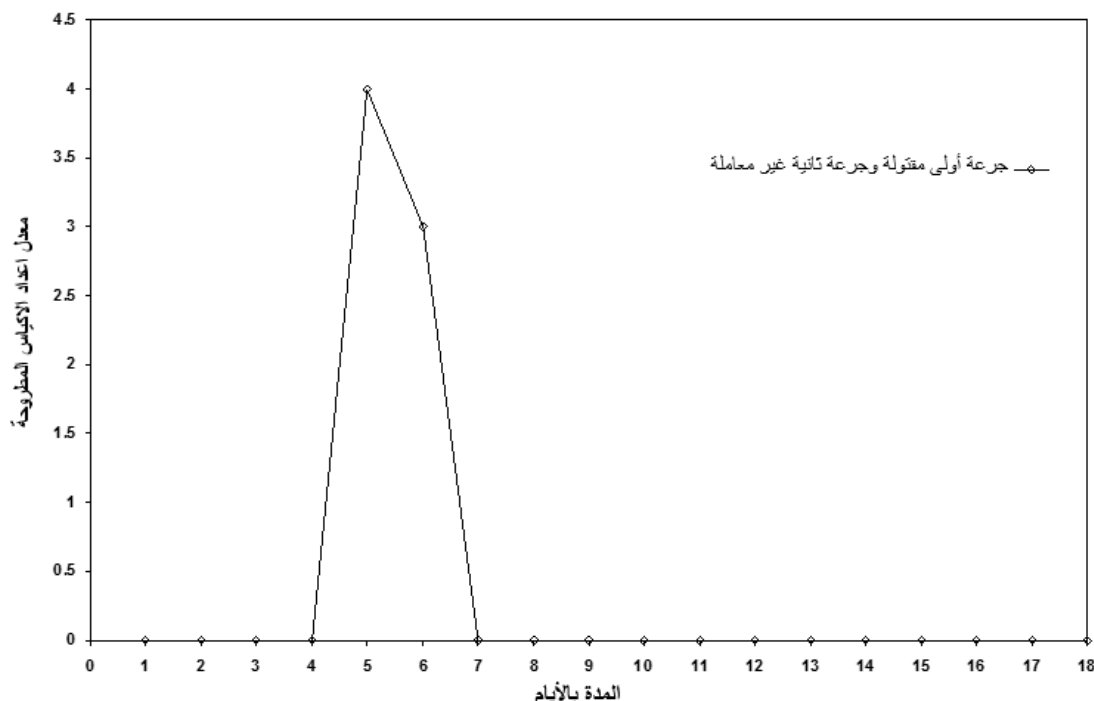
أما فيما يخص الفئران المجرعة بأكياس بيض مقتولة بالحرارة في الجرعة الأولى وغير معاملة في الجرعة الثانية فقد بدأت بطرح الأكياس اعتباراً من اليوم الخامس بعد إحداهن الإصابة الثانية، واستمرت بطرح الأكياس لغاية اليوم السادس، ووصل معدل طرح الأكياس ذروته عند اليوم الخامس بعد إحداهن الإصابة الثانية كما في الشكل (3).



الشكل (1) : معدل اعداد اكياس البيض المطروحة مع البراز للفئران المجرعة بأكياس بيض غير معاملة ومقتولة بالحرارة وجرعة واحدة مع الزمن



الشكل (2): معدل اعداد اكياس البيض المطروحة مع البراز للفئران المجرعة بأكياس بيض غير معاملة في الجرعة الأولى ومقتولة في الجرعة الثانية مع الزمن



الشكل (3): معدل اعداد اكياس البيض المطروحة مع البراز للفئران المجرعة بأكياس بيض مقتولة في الجرعة الأولى وغير معاملة في الجرعة الثانية مع الزمن

Total Leukocyte Count (TLC)

التعداد الكلي لكريات الدم البيض

بينت الدراسة التغيرات الحاصلة في معدلات الأعداد الكلية لكريات الدم البيض في الفئران المصابة، تجريبياً، بطفيل البويغيات الخبيثة من خلال تجريبيها أكياس بيض غير معاملة واخرى مقتولة بالحرارة، جرعة واحدة أو جرعتين. عند تجريب الفئران بأكياس بيض غير معاملة، جرعة واحدة فقط، لوحظ حدوث ارتفاع تدريجي في معدلات أعداد الكريات البيض منذ اليوم الثالث بعد إحداث الإصابة، عند مقارنتها بمجموعة السيطرة السالبة، إلا أن الفرق كان معنوياً ($P \leq 0.05$) بعد ثلاثين يوماً، إذ استمر العدد بالارتفاع.

أما عند إحداث إصابة بأكياس بيض مقتولة فقد ظهر العكس حيث انخفضت معدلات أعداد الكريات البيض عند اليوم الثالث من إحداث الإصابة إلا أنها بدأت بالارتفاع لتصبح مقاربة جداً لنظيراتها في مجموعة السيطرة السالبة بعد ثلاثين يوماً من إحداث الإصابة (الجدول 1). وعند تجريب الفئران بجرعتين من أكياس البيض، لوحظ، بصورة عامة، أنه عند استخدام أكياس بيض غير معاملة في الجرعة الأولى غير معاملة أو مقتولة في الجرعة الثانية كان الارتفاع في معدل أعداد الكريات البيض أعلى من نظائره في الحالة الأولى، وبدأ العدد بالانخفاض بعد ثلاثين يوماً من إحداث الجرعة الثانية، ماعدا تلك المجرعة بأكياس بيض مقتولة بالحرارة جرعة أولى وغير معاملة جرعة ثانية، إذ بدأ العدد بالارتفاع بعد ثلاثين يوماً من إحداث الإصابة الثانية (الجدول 2)

يوضح الجدول (3) مقارنة التعداد الكلي لكريات الدم البيض بين مجموعة الفئران المجرعة بأكياس بيض غير معاملة لجرعة واحدة ونظيراتها المجرعة بأكياس بيض غير معاملة بالجرعة الأولى ومقتولة بالحرارة بالجرعة الثانية بعد مدد مختلفة

(بالايام) من إحداه الإصابة. بعد 3 أيام من إحداه الإصابة الثانية، لوحظ ارتفاع في معدلات أعداد كريات الدم البيض. وبعد 15 يوماً من إحداه الإصابة الثانية لوحظ حدوث ارتفاع واضح في معدلات أعداد الكريات. أما بعد 30 يوماً من إحداه الإصابة الثانية، فقد لوحظ انخفاض واضح في معدلات أعداد الكريات.

وعند مقارنة أعداد الكريات البيض في الفئران المجرعة لمرة واحدة فقط بأكياس بيض مقتولة مع نظيراتها المجرعة جرعة أولى بأكياس بيض مقتولة لجرعة واحدة وجرعة ثانية لأكياس بيض غير معاملة ، لوحظ بانه بعد 3 أيام من إحداه الإصابة الثانية أن عدد الكريات ازداد. وبعد 15 يوماً من إحداه الإصابة الثانية لوحظ انخفاض في أعداد الكريات. أما بعد 30 يوماً من إحداه الإصابة الثانية فقد لوحظ الارتفاع في أعداد الكريات.

الجدول (1): معدلات التعداد الكلي لكريات الدم البيض في الفئران البيض المجرعة بأكياس بيض غير معاملة ومقتولة

بالحرارة بعد مدد مختلفة (بالايام) من إحداه الإصابة

المعدل			المدة بالأيام / المجاميع
30	15	3	
2566.67 b	3425.00 a	2075.00 bc	سيطرة سالبة
6308.33 a	3658.33 a	3150.00 ab	مجرعة غير معاملة مرة واحدة
2444.40 b	2394.43 b	1300.00 c	مجرعة مقتولة لمرة واحدة

المعدلات ذات الحروف المختلفة عمودياً أو أفقياً تعني وجود فرق معنوي عند مستوى $p \leq 0.05$ باستخدام اختبار دنكن

الجدول (2): معدلات التعداد الكلي لكريات الدم البيض في الفئران البيض المجرعة بأكياس بيض غير معاملة جرعة أولى

وغير معاملة أو مقتولة في الحرارة في الجرعة الثانية بعد مدد مختلفة (بالايام) من إحداه الإصابة

المعدل			المدة بالأيام المجاميع
30	15	3	
3416.67 b	9987.50 a	2975.00 ab	مجرعة غير معاملة مرتين
3333.30 b	4775.00 b	3700.00 a	مجرعة غير معاملة أولاً ومقتولة ثانياً
4466.67 ab	1813.87 c	2287.50 ab	مجرعة مقتولة أولاً و غير معاملة ثانياً

المعدلات ذات الحروف المختلفة عمودياً أو أفقياً تعني وجود فرق معنوي عند مستوى $(P \leq 0.05)$ باستخدام اختبار دنكن

الجدول (3): مقارنة بين معدلات التعداد الكلي لكريات الدم البيض في الفئران البيض المجرعة بأوكياس بيض غير معاملة لجرعة واحدة ونظيراتها المجرعة بأوكياس بيض غير معاملة في الجرعة الأولى وغير معاملة و مقتولة بالحرارة في الجرعة الثانية باستخدام اختبار t بعد مدد مختلفة (بالايام) من إحداث الإصابة

المعدل	المجاميع المجرعة	المعدل (مرة غير معاملة واحدة)	المدة (يوم)
2975.00	غير معاملة مرتين	3150.00	3
3700.00	غير معاملة أولاً ومقتولة ثانياً		
***9987.50	غير معاملة مرتين	3658.33	15
4775.00	غير معاملة أولاً ومقتولة ثانياً		
3416.67	غير معاملة مرتين	6308.33	30
3333.30	غير معاملة أولاً ومقتولة ثانياً		

* معنوي ($P \leq 0.05$) ، ** معنوي عال ($P \leq 0.01$) ، باستخدام اختبار t (t-test)

الجدول (4): مقارنة بين معدلات التعداد الكلي لكريات الدم البيض في الفئران البيض المجرعة بأوكياس بيض مقتولة لجرعة واحدة ونظيراتها المجرعة بأوكياس بيض مقتولة في الجرعة الأولى وغير معاملة في الجرعة الثانية باستخدام اختبار t بعد مدد مختلفة (بالايام) من إحداث الإصابة

المعدل	المجاميع المجرعة	المعدل	مرة واحدة معاملات مختلفة	المدة (يوم)
2287.50	مقتولة أولاً و غير معاملة ثانيا	1300.00	مقتولة	3
1813.87	مقتولة أولاً و غير معاملة ثانيا	2394.43	مقتولة	15
4466.67	مقتولة أولاً و غير معاملة ثانيا	2444.40	مقتولة	30

التعداد التفاضلي لكريات الدم البيض (Differential Leukocyte Count (DLC))

تبين من الجداول (5-8) التغيرات الحاصلة في معدلات التعداد التفاضلي لكريات الدم البيض في الفئران المصابة، تجريبياً، بطفيل البويغيات الخبيثة، أما من خلال تجريبها بأوكياس بيض الطفيل غير المعاملة أو المقتولة بالحرارة، جرعة واحدة أو جرعتين.

عند تجريب الفئران بأوكياس بيض غير معاملة غير معاملة، لجرعة واحدة، لوحظ وجود تناسب عكسي بين أعداد العدلات واللمفيات خلال فترات الفحص، إذ كانت أعداد اللمفيات مرتفعة مقارنة بأعداد العدلات المنخفضة والتي لم يلاحظ فيها فرقا يذكر عن مجموعة السيطرة السالبة. أما عند إحداث الإصابة بأوكياس بيض مقتولة لجرعة واحدة فقد لوحظ حدوث انخفاض في أعداد اللمفيات خلال فترات الفحص صاحبه ارتفاع واضح في أعداد العدلات للفترات نفسها. أما الحمضات ووحدات النواة بقيت بصورة عامة منخفضة خلال فترات الفحص ولكافة مجاميع الفئران المجمعة، جدول (5).

وعند إحداث الإصابة بأكياس بيض غير معاملة لجرعتين أو جرعة أولى غير معاملة والثانية مقتولة بالحرارة، لوحظ أن النتائج متقاربة مع نظيراتها المجرعة بأكياس بيض غير معاملة جرعة واحدة فيما يخص اللمفيات والعدلات. أما عند إعطاء جرعة أولى مقتولة وجرعة ثانية غير معاملة فقد لوحظ ارتفاع في معدلات اللمفيات صاحبه انخفاض في أعداد العدلات مقارنة بنظيراتها المجرعة بأكياس بيض مقتولة بالحرارة لجرعة واحدة، وبالنسبة للحمضات ووحدات النواة فلم يلاحظ فيها تغير يذكر. يلاحظ من جدول (7) وجود انخفاض معنوي ($P \leq 0.05$) في أعداد اللمفيات في الفئران المجرعة بأكياس بيض غير معاملة لجرعتين مقارنة بنظيراتها المجرعة بأكياس بيض غير معاملة لجرعة واحدة بعد ثلاثة أيام من إحداث الإصابة الثانية. أما العدلات، فقد ظهر فيها ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) في تلك الفئران المجرعة بأكياس بيض غير معاملة جرعتين بعد ثلاثة وخمسة عشر يوماً من إحداث الإصابة الثانية، وكذلك كان الارتفاع معنوياً ($P \leq 0.05$) ومعنوياً عالياً جداً ($P \leq 0.001$) بعد ثلاثين يوماً من إحداث الإصابة الثانية عندما كانت الجرعة الثانية مقتولة، ولم يلاحظ أي تغيير معنوي في أعداد الحمضات. أما وحدات النواة فلم يلاحظ فيها أي تغير معنوي بعد ثلاثة أيام من إحداث الإصابة الثانية، في حين لوحظ حدوث انخفاض معنوي في مجموعة الفئران المجرعة جرعة ثانية بأكياس بيض مقتولة ($P \leq 0.05$) بعد خمسة عشر يوماً و ثلاثين يوماً من إحداث الإصابة الثانية.

يوضح جدول (8) أن عدد الخلايا اللمفية ازداد معنوياً ($P \leq 0.001$) في الفئران المجرعة بأكياس بيض مقتولة كجرعة أولى وغير معاملة بوصفها جرعة ثانية منذ اليوم الثالث بعد إحداث الإصابة الثانية، واستمر هذا الارتفاع بعد ثلاثين يوماً من إحداث الإصابة الثانية. وبالنسبة للعدلات، فقد احتفظت بتناسبها العكسي مع اللمفيات. أما بالنسبة للحمضات ووحدات النواة، فلم تكن هناك زيادة معنوية ماعدا بعض الحالات القليلة.

الجدول (5): معدلات التعداد التفاضلي لكريات الدم البيض في الفئران البيض المجرعة بأكياس بيض غير معاملة ومقتولة بالحرارة بعد مدد مختلفة (بالايام) من احداث الإصابة

وحدات النواة			الحمضات			العدلات			اللمفيات			المدد بالايام	المجموع
30	15	3	30	15	3	30	15	3	30	15	3		
1.39b	3.33ab	0.76b	1.17a	3.00a	1.33b	7.29c	11.00b	8.66d	90.14a	82.67a	89.25a	سيطرة سالبة	
4.11a	5.36a	0.00b	1.45a	2.39ab	0.67b	6.85c	11.57b	11.03cd	88.61a	80.64a	88.30a	مجرعة غير معاملة مرة واحدة	
0.00b	1.01bc	2.56b	1.87a	0.00b	1.11b	13.81a	33.78a	61.54a	84.30b	65.20b	34.77b	مجرعة مقتولة مرة واحدة	

المعدلات ذات الحروف المختلفة عمودياً او افقياً تعني وجود فرق معنوي عند مستوى $p \leq 0.05$ باستخدام اختبار دنكن

الجدول (6): معدلات التعداد التفاضلي لكريات الدم البيض في الفئران البيض الجرعة باكياس بيض غير معاملة جرعة اولى وغير معاملة ومقتولة بالحرارة في الجرعة الثانية بعد مدد مختلفة (بالايام) من احداث الإصابة

المدة بالايام			اللمفيات			العدلات			الحمضات			وحدات النواة		
30	15	3	30	15	3	30	15	3	30	15	3	30	15	3
2.72bc	1.75abc	0.81c	1.37ab	2.33a	0.00b	6.14cd	21.64a	29.08a	89.77b	74.27c	70.10a	مجرعة غير معاملة مرتين		
0.00c	0.00c	1.00c	0.00b	0.00b	0.00b	15.02b	18.93ab	18.97abc	84.97bc	81.07bc	80.02a	مجرعة غير معاملة اولاً ومقتولة ثانياً		
0.67c	0.76c	0.43c	1.33ab	0.00b	0.00b	10.00bc	14.85abc	18.16abc	88.00b	84.38ab	81.41a	مجرعة مقتولة اولاً وغير معاملة ثانياً		

المعدلات ذات الحروف المختلفة عموديا او افقيا تعني وجود فرق معنوي عند مستوى $p \leq 0.05$ باستخدام اختبار دنكن

الجدول (7): مقارنة بين معدلات التعداد التفاضلي لكريات الدم البيض في الفئران البيض الجرعة باكياس بيض غير معاملة بجرعة واحدة ونظيراتها الجرعة باكياس بيض غير معاملة في الجرعة الاولى وغير معاملة ومقتولة بالحرارة في الجرعة الثانية باستخدام اختبار t بعد مدد مختلفة (بالايام) من احداث الإصابة

المدة (يوم)	المجاميع المجرعة		اللمفيات		العدلات		الحمضات		وحدات النواة	
	جرعة مفردة	جرعة مزدوجة	جرعة مفردة	جرعة مزدوجة	جرعة مفردة	جرعة مزدوجة	جرعة مفردة	جرعة مزدوجة	جرعة مفردة	جرعة مزدوجة
3	88.30	*70.1	11.03	*29.08	0.67	0.0	0.0	0.0	0.81	0.0
15	80.64	74.27	11.57	*21.64	2.39	5.36	2.33	0	1.75	*0.0
30	88.61	89.77	6.85	6.14	1.45	4.11	1.37	0	2.72	*0.0

* معنوي ($p < 0.05$) ، ** معنوي ($p < 0.01$) و *** معنوي ($p < 0.001$) باستخدام اختبار (t-test)

الجدول (8): مقارنة بين معدلات التعداد التفاضلي لكريات الدم البيض في الفئران البيض الجرعة باكياس بيض مقتولة بالحرارة لجرعة واحدة ونظيراتها الجرعة باكياس بيض مقتولة بالحرارة في الجرعة الاولى وغير معاملة في الجرعة الثانية باستخدام اختبار t بعد مدد مختلفة (بالايام) من احداث الإصابة

المدة (يوم)	المجاميع المجرعة		اللمفيات		العدلات		الحمضات		وحدات النواة	
	جرعة 1 مقتولة	جرعة 1 مقتولة + غير معاملة	جرعة 1 مقتولة	جرعة 1 مقتولة + غير معاملة	جرعة 1 مقتولة	جرعة 1 مقتولة + غير معاملة	جرعة 1 مقتولة	جرعة 1 مقتولة + غير معاملة	جرعة 1 مقتولة	جرعة 1 مقتولة + غير معاملة
3	34.77	***81.41	61.54	***18.16	1.11	0.00	2.56	0.43	0.43	2.56
15	65.20	84.38	33.78	14.85	0.00	0.00	1.01	0.76	0.76	1.01
30	84.30	*88.00	13.81	*10.00	1.87	1.33	0.00	0.67	0.67	0.00

* معنوي ($p < 0.05$) ، ** معنوي ($p < 0.01$) و *** معنوي ($p < 0.001$) باستخدام اختبار (t-test)

المناقشة

في الدراسة الحالية ظهر اول طرح لأكياس البيض في اليوم الرابع بعد إحداث الإصابة، وذلك عند إحداثها بأكياس بيض غير معاملة. هذه النتيجة تتفق مع ما وجدته كل من Al-Jarjary, Al-Mahmoud Bakir [21,20,19] في محافظة نينوى.

إن هذا التوافق يشير إلى ان الفترة قبل البائنة (الفترة بين حدوث الإصابة واول ظهور لأكياس البيض) ثابتة، في الإصابة غير المعاملة، إذ لا تقل عن 72 ساعة. من ناحية اخرى، فأن اختلاف عدد الأكياس المطروحة مع ما حصل عليه-Bakir, Al-Mahmoud [20,19] قد يكون بسبب اختلاف مصدر أكياس البيض المستخدمة لإحداث الخمج، حيث أن الباحثين إستخدما أكياس بيض مصدرها العجول، في حين استخدمت Al-Jarjary [21] أكياس بيض مصدرها الإنسان، كما هو الحال في الدراسة الحالية. فضلاً عن ذلك فان الاختلاف في طريقة حساب عدد أكياس البيض المطروحة قد يكون سبب اختلاف النتائج أيضاً، حيث أن كلا من Bakir, Al-Mahmoud [20,19] اعتمدا حساب عدد الأكياس في الغرام الواحد من البراز، في حين استخدمت Al-Jarjary [21] كما هو الحال في الدراسة الحالية، طريقة الحساب لكل حقل مجهري.

في الدراسة الحالية، استمر طرح أكياس البيض في الفئران البيض، في الإصابة التجريبية بأكياس بيض غير معاملة، منذ اليوم الرابع بعد إحداث الإصابة ولغاية اليوم الخامس والثلاثين بعد إحداتها، ثم توقف طرح الأكياس.

عند تعريض أكياس البيض إلى درجة حرارة 70°C لمدة 30 دقيقة، لوحظ بان جميع أكياس البيض قد فقدت خمجيتها، إذ لم تظهر أكياس البيض في البراز، وهذا يتفق مع ما جاء به الباحثون السابقون Harp et al., Fayer et al., Blewett et al., Anderson [25,24,23,22] الذين اشاروا إلى ان تعريض أكياس البيض إلى درجة حرارة 72.4°C أو اكثر قليلا لمدة دقيقة واحدة أو اكثر و 73.7°C لمدة 5 ثوان أو اكثر قليلا جعلت من أكياس البيض غير قادرة على إحداث الخمج في الفئران البيض. وكذلك فانه عند تعريض أكياس البيض لدرجة حرارة 71.7°C لمدة 5، 10 و 15 ثانية ودرجة حرارة 72.4°C أو اكثر لمدة دقيقة واحدة جعل من أكياس بيض *C. parvum* غير قادرة على إحداث الخمج في الفئران البيض التي كانت بأعمار صغيرة. وبصورة عامة تم الحصول على النتائج نفسها إذا كانت أكياس بيض الطفيل معاملة بالماء أو بالحليب [26, 22]. من ناحية اخرى فقد اشار Fujino et al. [27] إلى أن تعريض أكياس بيض الطفيل *C. parvum* إلى درجة حرارة 70 °C لمدة 60 ثانية قد أفقد جميع أكياس البيض خمجيتها في الفئران البيض والدجاج أيضاً. ولتبيان مدى تاثير درجة حرارة 70 °C وما فوقها على خمجية أكياس بيض الطفيل، فقد لاحظ Fayer [23] ان تعريض أكياس بيض الطفيل *C. parvum* إلى درجة حرارة 72.4 °C أو أعلى لمدة دقيقة واحدة قلل من عدد أكياس البيض الخمجة المطروحة مع البراز من 150000 إلى عدد تتراوح بين 0-25 كيس بيض خمج، كذلك فإنه عند تعريض أكياس البيض للدرجة الحرارية نفسها المذكورة سابقا وللفترة الزمنية نفسها، أدى إلى فقدان خمجية أكياس البيض تماماً [28]. ووضحت دراسة اخرى بان تعريض أكياس بيض طفيل *C. parvum* إلى درجة حرارة 75°C لمدة 15 ثانية و60 ثانية خفض حيوية أكياس البيض إلى 53.7% و11.2%، على التوالي، بحيث اصبحت أكياس البيض للطفيل غير قادرة على إحداث الخمج خارج الجسم الحي في خلايا HCT-8 [29] ومن الجدير بالذكر أن Bowman et al. [30] اشاروا إلى ان أكياس البيض يمكن ان تبقى حية في التربة ما لم تتعرض إلى درجات حرارة متطرفة (أقل من صفر درجة مئوية وأعلى من 65 °C).

عند استخدام أكياس بيض مقتولة فقد انخفض العدد الكلي لكريات الدم البيض في بداية الإصابة ثم بدأ يرتفع بعد ثلاثين يوماً ليعود إلى وضعه الطبيعي. ومما تجدر الاشارة اليه ان معظم الباحثين الذين درسوا صورة الدم في الفئران البيض التي أحدثوا فيها إصابة بالطفيليات لاحظوا زيادة في التعداد الكلي لكريات الدم البيض، وقد أعزوا هذه الزيادة إما للتأثير المباشر لمستضدات خاصة اصلها الطفيل كما هي الحال عند إحداث إصابة بالفئران بالأكياس العدوية الثانوية، إذ اشار الباحثون في

سنوات سابقة Siracusano,1988, Shepherd, 1991, Profumo ,1994, Jenkins *et al.*, 1986 الى أن سبب الارتفاع هو بروتينات معينة موجودة في السائل العدي للكريس هي BH5PPT، BH5SUP، والمستضدات (5) A و B، أو التأثير المباشر للرؤيسات الأولية في الكيس العدي كونها مشطرة غير تخصصية لخلايا T و (B) . [34,33,32,31]

إن ما لوحظ في الدراسة الحالية من ارتفاع مستمر في التعداد الكلي لكريات الدم البيض عند استخدام أكياس بيض غير معاملة يمكن ان يعزى إلى تثبيط عمل العدلات من قبل مستضدات الطفيل، وعليه لم تحفز هذه الخلايا على الهجرة إلى موقع الخمج. وما يدعم هذا الافتراض هو الانخفاض الذي لوحظ عند استخدام أكياس بيض مقتولة بالحرارة الذي ربما ألغى عملية التثبيط هذه وأدى إلى هجرة العدلات الذي أدى بدوره إلى انخفاض التعداد الكلي لكريات الدم البيض.

في الدراسة الحالية لوحظ بأنه عند اعطاء جرعة ثانية من أكياس البيض سواء كانت الجرعة غير المعاملة جرعة أولى أو ثانية ارتفع العدد الكلي لكريات الدم البيض مقارنة بنظائرها عند اعطاء جرعة واحدة. هذا يشير إلى ان الجرعة الثانية تزيد من الاستجابة المناعية للمضيف، وقد أكدت ذلك كل من Aghwan, Al- Barrwari [36,35] عند اعطائهما جرعة ثانية من المقوسات الكوندية للفئران البيض بهدف دراسة الاستجابة المناعية الخلطية في المضيف، إذ أشارت Al- Barrwari [36] ان معايير الضد Igm ارتفعت واستمر بقاءها مرتفعا لفترة 15 يوماً بعد الحقن الثاني.

أما فيما يتعلق بالتعداد التفاضلي لكريات الدم البيض، فقد اظهرت نتائج الدراسة الحالية انخفاضاً في أعداد اللمفيات في الأيام الثلاثة الأولى بعد إحداث الإصابة صاحبه ارتفاع في أعداد العدلات وانخفاض في أعداد الحمضات وارتفاع في أعداد الخلايا وحيدة النواة، في حين لم تؤخذ القعدات بنظر الاعتبار في الدراسة الحالية لكون نسبتها قليلة جداً. سجل الانخفاض الطفيل الذي لوحظ في أعداد اللمفيات خاصة في الايام الثلاثة الأولى من قبل Janssen *et al.* [37] عند معاملتهم للفئران بأحد الأجزاء السامة المستخلصة من سائل الأوكياس العدي وهو F7. كذلك لوحظ هذا الانخفاض من قبل باحثين اخرين في الفئران المعاملة بلقاح BCG، والفئران غير المفعلة المخمجة بالرؤيسات الأولية للمشوكات متعدد الحجات وللغفران غير المفعلة المخمجة بالرؤيسات الأولية للمشوكات الحبيبية. ان الانخفاض الطفيل في أعداد الخلايا اللمفاوية الذي لوحظ في الدراسة الحالية قد يكون بسبب ارتفاع أعداد العدلات التي ولم تهجر إلى مواقع الخمج وقد يكون الانخفاض للموازنة مع ارتفاع العدلات. [41,40,39,38]

من النتائج التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية يمكن استنتاج أن أكياس تفقد البيض جزءاً من خمجيتها بدليل انخفاض فترة بقائها في المضيف وعدد أكياس البيض المطروحة، في حين تكون أكياس البيض حساسة عند درجة الحرارة (70 °C) إذ انها تقتل بسرعة في هذه الدرجة الحرارية. قد تحفز الإصابة بأكياس البيض غير المعاملة الاستجابة المناعية الطبيعية (اللانوعية) من خلال تحفيز الخلايا المناعية على التكاثر.

المصادر

1. Hendrix CM Diagnostic Veterinary Parasitology. 2nd ed., Mosby, pp. 19-34 (1998) .
2. Das P, Roy SS, Mitradhar K, Dutta P, Bhattacharya MK, Sen A, Ganguly S, Bhattacharya SK, Lal AA, Xiao L, India. J. Clin. Microbiol., 44(11): 4246-4249 (2006) .

3. Fayer R Advances in *Cryptosporidium* research. International *Giardia* and *Cryptosporidium* conference. Moreilia-Michoacan, Mexico (Spiral Bound Book) (2007).
4. Luna LG) Manual of Histological Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd ed. The Blakiston Division, McGraw-Hill Book Comp., New York (1968) .
5. OIE World Organization for Animal Health Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 5th ed, Retrieved from Internet: <http://www.oie.int/> / (2005).
6. Henriksen SA, Pohlenz JF (1981) Acta Vet. Scand., 22: 594-596. Al-Barrwari, N.J.S., M. Sc. Thesis, Coll. Edu.. University of Mosul (2006) . (In Arabic).
7. Ma P, Soave R. J. Infect. Dis., 147: 824-828 (1983).
8. Deluol WH Color Atlas of Parasitology. Vol. 2 Format Utile, France: pp. 34-63 (1999).
9. Feire-Santos F, Oteiza-Lopes AM, Vergara-Castiblanco CA, Area-Mazas ME, Vet. Parasitol., 87: 1-7 (1999).
10. Anderson BC, J. Am. Vet. Med. Assoc., 178: 982-984 (1981).
11. Lindsay DS, Woods KM, Upton SJ, Blagburn BL. Vet. Parasitol., 89: 307-311(2000).
12. Woods KM, Nesterenko MN, Upton SJ. Ann. Trop. Med. Parasitol., 90(6): 603-615 (1996).
13. Viu M, Quilez J, Sanchez-Acedo C, Delcacho E, Lopez-Bernad F. Vet. Parasitol., 90: 163-170 (2000).
14. Khalifa AM, Ibrahim IR, El-Kerdany ED. East Medit. Hlth. J., 6(5): 908-918 (2000).
15. Waynforth HB Experimental and Surgical Technique in the Rats. Academic Press Inc., London, LTDNWI, p. 29 (1980).
16. Talib VH, Director C A Handbook of Medical Laboratory Technology. Tara Printers. Noida., 9-14 (1988).
17. Dacie JV, Lewis SM Parasitological Haematology. 6th ed., Churchill Livingstone Publication (1986).
18. Al-Rawi K.M., KHalaf-Allah A.M. Design and Analysis of Agricultural Experiments. Text book print Mosul University, Iraq (1980). (In Arabic).
19. Bakir, M. H., Ph.D. Thesis, coll. Vet. Med. University of Mosul, Iraq (2005). (In Arabic).
20. Al-Mahmoud, S.S. F., M. Sc. Thesis, coll. Vet. Med. University of Mosul, Iraq (2006). (In Arabic)
21. Al-Jarjary, S.A.A., Ph. D. Thesis, Coll. Sci. University of Mosul, Iraq (2006). (In Arabic).
22. Harp JA, Fayer R, Pesch BA, Jackson GJ., Appl. Environ. Microbiol., 62(8): 2866-2868 (1996).
23. Fayer R., Appl. Environ. Microbiol., 60(8): 2732-2735 (1994).
24. Blewett DA Quantitative techniques in *Cryptosporidium* research. pp. 85-98. In: KW Angus and DA Blewett (eds.), Proc., 1st Int. Workshop. Cryptosporidiosis, Edinburgh, Scotland (1989).
25. Anderson BC (1985)., Am. J. Public Hlth., 75: 1433-1434.
26. Casemore DP, Watkins J (1999)., DETR: 56FP.
27. Fujino T, Matsui T, Kobayashi F, Haruki K, Yoshino Y, Kajima J, Tsuji M., J. Vet. Med. Sci., 64(3): 199-200 (2002).
28. Donnelly JK, Stentiford EI., Manag. Hlth., 8(4): 112-123 (1997).
29. Moriarty EM, Duffy G, McEvoy JM, Caccio S, Sheridan JJ, McDowell D, Blair IS., J. Appl. Microbiol., 98(3): 618-623 (2005).

30. Bowman DD, Lynn RC, Eberhard ML. *Georgis Parasitology for Veterinarians*. 8th ed., Saunders, pp. 98-100 (2003).
31. Siracusano A, Teggi A, Quintieri F, Notargiacomo S, De Rosa F, Vicari G., *Clin. Exp. Immunol.*, 72: 400-405 (1988).
32. Shepherd JC, Antiken A, McManus DP., *Mol. Biochem., Parasitol.*, 44: 81-90 (1991).
33. Profumo E, Ortona E, Rigano R, Gioia I, Notargiacomo S, Ioppolo S., *Parasit. Immunol.*, 16(8): 393-398 (1994).
34. Jenkins DJ, Dixon JB, Ross G, Cox DA., *Ann. J. Trop. Med. Parasitol.*, 80: 43-47 (1986).
35. Aghwan, S.S., ph. d. thesis, coll. vet. med. university of mosul, Iraq (2005). (in Arabic).
36. Al-Barrwari, N.J.S., M. Sc. Thesis, Coll. Edu.. University of Mosul (2006). (In Arabic).
37. Janssen D, Rueda MC, DeRycke PH, Osuna A., *Parasit. Immunol.*, 19: 149-160 (1997).
38. Reuben JM, Tanner CE, Portelance V., *Infect. Immunol.*, 21: 135-139 (1979).
39. Ali-Khan Z., *J. Parasitol.*, 60(2): 236-242 (1974).
40. Du T, Ali-Khan Z., *J. Exp. Pathol.*, 71: 313-335 (1990).
41. Al-Mutaywiti, S.S.Y., M. Sc. Thesis. Coll. Edu. University of Mosul (2005). (In Arabic).