

تأثير بعض الإضافات العلفية على الأفراخ المصابة تجريبياً بالسالمونيلا

بتول كاظم متعب علاء عبد العزيز عبد

كلية الطب البيطري / جامعة القادسية

email: alla.abed@qu.edu.iq

(الاستلام 17 كانون الثاني 2016 ، القبول 28 اذار 2016)

الخلاصة

صُممت الدراسة الحالية للتحري عن الآثار الأيجابية التي قد تنتج من استخدام مزيج الأحماض العضوية التجاري X-Mold Cid® وقشور الرمان بوصفها إضافات غذائية وأمكانية استخدامها في التقليل من شدة الخمج بالسالمونيلا من خلال تقليل اعدادها وتقليل معدل الطرح ونسبة الاصابة. شملت التجربة دراسة كفاءة الإضافات الغذائية المذكورة ضد عزلة *Salmonella enteritidis* وذلك بعد أحداث الإصابة التجريبية للأفراخ حيث تم تقسيم 120 فرخة بعمر 5 أيام الى أربعة مجاميع وبواقع 30 فرخاً لكل مجموعة ، مثلت المجموعة الأولى السيطرة السالبة وتناولت العليقة الأساسية والمجموعة الثانية مثلت السيطرة الموجبة وقد تناولت العليقة الأساسية وأعطيت جرعة التحدي (1×10^8 مل/مستعمرة) من جراثيم *Salmonella enteritidis* أما المجموعتين الأخرين فقد أصيبت وبالجرعة نفسها مع إعطاء المجموعة الثالثة قشور الرمان بمقدار 5غم / كغم علف والمجموعة الرابعة خليط الأحماض العضوية بجرعة 1مل / لترماء. أستمرت التجربة 40 يوماً تم أثنائها تقييم كفاءة الإضافات الغذائية ضد عزلة *Salmonella enteritidis* حيث أوضحت النتائج القابلية الجيدة لكلا الإضافتين في تقليل شدة الإصابة من خلال خفض نسبة العزل للجرثومة من المسحاة المجمعة (معدل طرح ا لسالمونيلا) ونسبة عزل السالمونيلا من محتويات الأعورين (نسبة الإصابة) وكذلك العدد الكلي للبكتيريا ، كما تمت دراسة بعض المعايير الدموية التي شملت عدد خلايا الدم البيض ونسبة H / L ، حيث سجلت الدراسة ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) في معدل كريات الدم البيض وانخفاض معنوي ($P < 0.05$) في نسبة H / L في مجاميع المعاملة. الكلمات المفتاحية: إضافات علفية ، اصابات السالمونيلا ، فروج اللحم ، احماض عضوية ، قشور الرمان

Effect of some feed additives on the impact of experimentally infected chickens with *Salmonella*

Batool Kadhim Meteab Alaa Abdul Aziz Abed
Coll. of Vet. Med. / Univ. of Al-Qadisiyah

Abstract

The present study was designed to investigate the positive effects that may result from the use commercial organic acids mixture X-Mold Cid® and pomegranate peels as nutritional supplements to reduce the severity of infection with *Salmonella* by reducing the bacterial count and reduce the infection and incidence or shedding rate. The experiment included the study of efficiency of additions food additives mentioned against the experimental infection of *Salmonella enteritidis*, 120 chicks aged 5 days divided in to four groups each group contain 30 bird were used, the first group represented the negative control and dealt with the basic diet and the second group represented the positive control has dealt with the basic diet and was given a challenge dose (1×10^8 ml / cfu) of the *S. enteritidis* bacteria. The two other groups were challenged by the same dose, the third group give pomegranate peels with dose of 5 g / kg feed and the fourth group give a mixture of organic acids at a dose of 1 ml / L of water. The experiment lasted for 40 days for evaluating the efficiency of food additives against *Salmonella enteritidis*. The results showed good ability of both additives in reducing the severity of the infection by reducing the shedding rate of the *S. enteritidis* and the percentage of infection of cecal contents as well as the total number of bacteria. Some blood parameters have been studied also which included a number of white blood and the ratio of H / L cells, the study recorded the increase significantly ($P < 0.05$) in white blood cells rate and a significant decrease ($P < 0.05$) in proportion H / L in treated groups.

Key words: food additives, *Salmonella* infections, chickens, organic acids, pomegranate peel

المقدمة

تعد السالمونيلا من الأمراض المشتركة الخطيرة بين الإنسان والحيوان حيث تم عزل ما يقارب 2500 نمط مصلي من مختلف المضافات وكثير منها لها علاقة بأصابات الإنسان (1) وأشهر تلك الانماط المصلية هي جراثيم *S. enteritidis* التي تسبب الكثير من الخسائر الاقتصادية للمنتجين ، بالإضافة الى تلوث لحوم الدواجن اثناء التصنيع ولازالت تشكل تحدياً كبيراً للصحة العامة (2,3) ويعتبر هذا النمط المصلي من أخطر الأنماط المصلية المسببة للتسمم الغذائي وأكثرها انتشاراً منذ عام 1999 الى العام 2008 (4) ، فهناك ما يقارب 75% من هذه الحالات عائدة لهذا النمط من جراء تناول لحوم الأبقار ولحوم الدواجن والبيض الملوث بهذه الجرثومة (5) و برغم استخدام المضادات الحيوية كمحفزات نمو لكنها لا تعتبر ضمن قائمة الإضافات العلفية بسبب طريقة عملها لذلك كان لا بد من وجود بديل أو استراتيجية معينة للحد من أصابات السالمونيلا ومن تلك البدائل هي استخدام الأحماض العضوية (6) التي تقوم بتغيير بيئة الامعاء بحيث تصبح غير مناسبة للسالمونيلا اضافة لتأثيرها المباشر على تلك الجراثيم وكذلك بعض النباتات الطبية ، مثل قشور الرمان *pomegranate peels* حيث تُعد مضاد بكتيري (7) ومضاد فطري و فيروسي وذو فعاليات مضادة للأكسدة (8,9) ويبدو ان الأحماض العضوية وبعض الزيوت النباتية والأعشاب الطبية تعمل على إعادة التوازن الميكروبي في بيئة الأمعاء (10)، كما تعزى فعالية قشور الرمان الى احتوائها على العديد من المركبات المهمة مثل التانينات والكلايكوسيدات والصابونيات والفلافونيدات والراتنجات والقلويدات والفينولات (11). تهدف هذه الدراسة الى تقييم بعض الإضافات العلفية في تثبيط أستيطان جراثيم السالمونيلا ومدى قدرتها على تقليل شدة واستمرارية الإصابة التجريبية بالسالمونيلا الملهبة *S. enteritidis*.

المواد وطرائق العمل

تصميم التجربة

استخدمت في التجربة أفراخ لحم نوع (Ross 308) غير مجنسة وبعمر يوم واحد تم جلبها من مفسس بركات الزهراء / آل حمد / ديوانية عدد 120 فرخة وربيت منذ اليوم الأول في غرفة معزولة في اليوم الخامس من مدة التربية قسمت إلى 4 مجاميع في اربعة أقفاص منفصلة مع توفير كل مستلزمات الإدارة والتربية ، غُذيت الأفراخ منذ اليوم الأول على عليقة البادئ ثم استبدلت بعليقة النامي ، اما البرنامج الوقائي فقد تم تلقيح نيوكاسل بماء الشرب بعمر يوم واحد وعمر عشرة ايام و تم التلقيح ضد مرض كمبورو بعمر 13 يوم.

تركيب الإضافات العلفية

الخليط التجاري $\text{Mold Cid}^{\circledR} \text{X} - 0.5 \text{ ML}$ / لتر ماء) يتكون من حامض استيك 10% ، حامض بروبونيك 20% ، حامض فورمك 20% ، حامض فسفوريك 10% ، حامض لاكتيك 10% X VET GmbH Hamburg Germany.

قشور الرمان (*Pomegranate peels*) (5 غم / كغم علف) مسحوق قشور الرمان (السوق المحلي).

فحص الأفراخ

لغرض التأكد من عدم وجود إصابة من المفسس وخلو الأفراخ من السالمونيلا تم أخذ مسحات قطنية مخرجية ومن محتويات الأعورين عشوائياً لأجراء الزرع الجرثومي بواقع 12 فرخة من مجموع الأفراخ.

أختيار النمط المصلي للأصابة

تم اختيار النمط المصلي *Salmonella enteritidis* المعزول مسبقاً في مختبر الدراسات والبحوث / كلية الطب البيطري / جامعة القادسية لغرض تحضير جرعة التحدي.

تحضير جرعة التحدي

تم تحضير وحساب جرعة التحدي بتحديد قيمة التركيز القاتل الأدنى للجرثومة (12) باستخدام جهاز (Densi CNEX) (Densimeter) في مختبر الدراسات والبحوث / كلية الطب البيطري / جامعة القادسية بينت القراءة في الجهاز لمرق الزرع (MCF 0.5) وهي ما تساوي 3×10^8 مل / مستعمرة cfu ثم خففت بـ 2 مل من الماء المقطر (13) للحصول على جرعة الاصابة المقررة 1×10^8 مل / مستعمرة.

المعاملة الأولى: معاملة السيطرة السالبة: أعطيت العليقة الأساسية بدون إضافة أو إصابة وتم أبعاد أفراخ هذه المجموعة بعد الإصابة التجريبية عن بقية المجاميع. المعاملة الثانية: أعطيت العليقة الأساسية + جرعة التحدي المعاملة الثالثة: أعطيت العليقة الأساسية مضافاً إليها قشور الرمان بمقدار 5 غم / كيلو غرام علف + جرعة التحدي. المعاملة الرابعة: أعطيت العليقة الأساسية + 1 مل / لتر ماء خليط الأحماض العضوية + جرعة التحدي.

الزرع الجرثومي

تم الزرع على وسط الكروم ، ثم حضنت الأطباق بدرجة 37 مئوية ولمدة 24 ساعة في الحاضنة الخاصة بالزرع الجرثومي.

معدل طرح السالمونيلا

بعد الإصابة التي تمت بعمر 5 يوم أخذت مسحات من المجمع (Cloacal Swabs) بعمر (12 ، 19 ، 26 ، 33 ، 40) يوم ووضعت في أنابيب اختبار حاوية على 9 مل / أنبوب من السلنات (وهو وسط أختياري أغنائي Selective enrichment لنمو جراثيم السالمونيلا حيث يعمل على تثبيط نمو اغلب الجراثيم المنافسة) وبواقع ثلاثة أفراخ من كل مجموعة ووضعت جميعاً في الحاضنة بدرجة 37 مئوية ولمدة 24 ساعة وبعد ذلك أجريت عملية الزرع على وسط الكروم وتم تشخيص الأوساط الموجبة من السالبة الزرع وبعدها تم التشخيص التأكيدي باستخدام جهاز الفايبيك.

معدل نسبة الإصابة

قُتلت ثلاثة أفراخ من كل مجموعة في نفس وقت اخذ المسحة القطنية حيث تم أخذ 1 غم من محتويات الأعورين من كل طير ومزجت جيداً بـ 1 مل من الماء المقطر ، حُضرت 6 أنابيب حاوية على 9 مل من الماء المقطر ، أُضيف 1 مل من هذا العالق إلى الأنبوب الأول ليصبح تخفيفه 10^{-1} وأخذ 1 مل من الأنبوب الأول إلى الأنبوب الثاني ليصبح تخفيفه 10^{-2} وهكذا إلى الأنبوب الأخير (السادس 10^{-6}) ليهمل 1 مل منه بعد إكمال

Natt and Herrick (RIOR, W. Germany -) ، واستخدم محلول الدم الطيور الخاص لتخفيف هذه الخلايا في دم الطيور (16).

قياس نسبة الخلايا المتغيرة الهيتروفيل / اللمفوسايت

عُملت مسحات من الدم بشكل مباشر من الطيور على شرائح زجاجية بوضع قطرة من الدم على الشريحة الزجاجية من أنبوب شعري ثم ينشر الدم على الشريحة باستعمال شريحة زجاجية أخرى حيث توضع قطرة من الدم وتسحب فوق الشريحة الأولى بزاوية 45 درجة وبدون الضغط عليها وبعد جفاف الدم بحوالي 10 دقائق تصبح الشرائح بمزيج من صبغتي Wright - Giemsa وفقاً لطريقة (17) بعد ذلك يكون العد باستعمال المجهر الضوئي وعلى قوة تكبير X100 بوضع قطرة زيت على الشريحة حسب طريقة (18) ومن ثم حساب نسبة خلايا الهيتروفيل (الخلايا المتغيرة) إلى خلايا اللمفوسايت H/L.

التحليل الإحصائي

حللت النتائج لإحصائياً بالاعتماد على اختبار مربع كاي (19) مع الانحراف المعياري للقيم المدروسة (20) ، كما استخدمت الاختبارات التحليلية المتضمنة الطرق one way ANOVA and two way ANOVA واختبار أقل معنوية تحت مستوى (P<0.05) للتأكد فيما إذا كانت هنالك فروقات معنوية بين المعاملات المختلفة (21).

مجاميع المعاملة الثالثة والرابعة فقد انخفضت اعداد البكتيريا انخفاضاً معنوياً تحت مستوى احتمال (P<0.05) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة ، بينما اظهرت نتائج المجموعة الثالثة عدم وجود فرق معنوي في اليوم 12 و 19 من مدة التجربة حيث كان العدد الوغارتمى هو 1.94 لكلا الفترتين وبالمقارنة مع المجموعة الرابعة فقد سجلت نفس القيمة تقريباً 1.9 بعمر 12 يوم ، بينما انخفضت اعداد السالمونيلا معنوياً للمجموعة الرابعة وفق القيم التالية 1.36, 0.6, بالمقارنة بالمجموعة الثالثة وفق القيم التالية 1.94, 1.07, 0.77 بالأعمار 19 و 26 و 33 على التوالي بينما تساوت النتيجة بعمر 40 يوم .

عامل الحماية

جدول (1) يبين مقارنة النتائج بين مجموعة السيطرة ومجموعتي المعاملة في العدد اللوغاريتمي للسالمونيلا أظهرت النتائج وجود درجة جيدة من الحماية للمعاملتين كما بينت النتائج تفوق المجموعة الرابعة في عامل الحماية عموماً وفي اليوم 19 و 26 خصوصاً وبقيمة 1.58, 3.33 على التوالي بالمقارنة مع المجموعة الثالثة.

معدل إصابة الأعرين

يبين الجدول رقم (2) تأثير الإضافات العلفية على نسبة الإصابة بجرثومة الـ *S. enteritidis* في الأعرين حيث سجلت مجموعة السيطرة الموجبة أعلى النسب وكانت النسبة الكلية لها 93.3% بمجموع 14/15 ، بينما كانت النسبة للمجموعة الثالثة 46.6% وبمجموع 7 / 15 ، أما المجموعة الرابعة فنسبتها الكلية كانت 26.6% بمجموع كلي يساوي 4/15 ، بينما لم تسجل مجموعة السيطرة السالبة اي إصابة وبفروقات معنوية بين كل المجاميع.

التخفيفات الستة لكل طير (13) ، تم أخذ 0.1 مل من التخفيف (10^{-4}) ووضعت في أطباق بتري لوسط الكروم وبعد تحريك الطبق نشرت يميناً ويساراً وضعت في الحاضنة بدرجة 37 مئوية ولمدة 24 ساعة (12) وبعد ذلك تم حساب المستعمرات الجرثومية حسب (14).

عامل الحماية

تم الحصول على عامل الحماية من تقسيم العدد اللوغاريتمي لبكتيريا السالمونيلا لكل غرام من محتويات الأعرين لمجموعة السيطرة ($\log_{10} \text{ gm}$) على العدد اللوغاريتمي لبكتيريا السالمونيلا لكل غرام من محتويات الأعرين لكل معاملة من المعاملات للفترة ذاتها وحسب (15).

المعايير الدمية

جمع عينات الدم

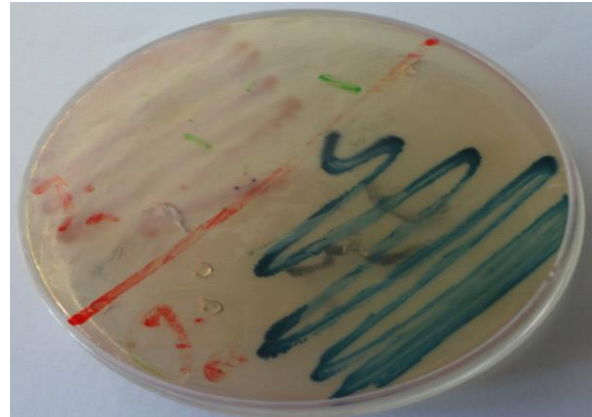
جُمعت عينات الدم من الوريد العضدي من الجهة الأنسية للجناح لخمسة دجاجات من كل معاملة وذلك في نهاية كل عشرة أيام من بعد الإصابة ، ووضعت النماذج في أنابيب حاوية على مانع تخثر EDTA وقيست الصفات الخلوية للدم والمتمثلة بالآتي :

عد خلايا الدم البيض

استخدمت طريقة العد بواسطة جهاز الهيموسايتوميتر Neubaur - Champer Haemocytometer (SUPE

النتائج

بعد مرور سبعة أيام من الإصابة challenge ومن خلال استخدام الوسط الزراعي التفرقي (الكروم) ظهرت جراثيم *S. enteritidis* على شكل مستعمرات دائرية الشكل لزجة القوام ذات لون وردي مائل الى البنفسجي كما في الشكل (1).



الشكل (1): مستعمرات السالمونيلا *S. enteritidis* على وسط الكروم

العد الجرثومي

يوضح الجدول (1) تأثير الإضافات الغذائية على أعداد جرثومة الـ *Salmonella enteritidis* المعزولة من الأعرين ، حيث سجلت مجموعة السيطرة الموجبة أعلى القيم في أعداد البكتيريا المعزولة وفي كل الأيام وبفرق معنوي تحت مستوى احتمال (P<0.05) بالمقارنة مع باقي المجاميع المعاملة حيث كانت أعلى قيمة في أعداد البكتيريا المعزولة في اليوم 12 من مدة التجربة هي 2.37 ، وأدنى قيمة كانت لهذه المجموعة في اليوم الأربعين هي 1.29 .

الجدول (1): تأثير الإضافات الغذائية على العد الجرثومي (\log_{10}/gm) وعامل الحماية Protection Factor للسالمونيللا *Salmonella enteritidis*

PF	\log_{10} cfu/g	PF	\log_{10} cfu/g	PF	\log_{10} cfu/g	PF	\log_{10} cfu/g	PF	\log_{10} cfu/g	الأيام المجاميع
	40 يوم		33 يوم		26 يوم		19 يوم		12 يوم	1م
-	0Aa	-	0Aa	-	0Aa	-	0Aa	-	0Aa	2م
-	1.59Be	-	1.75Bd	-	2Bc	-	2.16 Bb	-	2.37 Ba	3م
-	0Ad	2.27	0.77Cc	1.86	1.07Cb	1.11	1.94Ca	1.22	1.94 Ca	4م
-	0Ac	-	0Ac	3.33	0.6Ac	1.58	1.36Db	1.24	1.9 Ca	

تدل الحروف الكبيرة على القراءة الإحصائية العمودية بين المجاميع في حين تدل الحروف الصغيرة على القراءة الإحصائية الأفقية بين الأوقات وتدل الحروف المتشابهة على عدم وجود فروق إحصائية معنوية بين المعاملات في حين تدل الحروف المختلفة إلى وجود فروق معنوية تحت مستوى احتمالية ($P < 0.05$).

يوضح الجدول (4) تأثير الإضافات العلفية على معدل

عدد خلايا الدم البيض لمجاميع التجربة ، حيث سجلت النتائج فروقات معنوية في أعداد كريات الدم البيض للمجموعة الثانية 16.31, 17.45, 13.53 بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة 15.71, 15.85, 15.97 في عمر 15 و 25 و 35 يوم على التوالي ، بينما تفوقت معنوياً مجموعتي المعاملة الثالثة 19.3, 20.44, 20.18 والرابعة 19.73, 20.16, 21.21 عن مجموعة السيطرة السالبة والموجبة بعمر 15 و 25 و 35 يوم وعلى التوالي و يلاحظ ان اكثر انخفاض كان بعمر 35 للمجموعة الثانية مقارنة مع المجموعة الثالثة والرابعة تحت مستوى احتمال ($P < 0.05$).

نسبة (H / L Ratio)

يبين الجدول (5) تأثير الإضافات العلفية لمجاميع التجربة الأربعة في نسبة H / L حيث أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية لمجاميع التجربة الأولى 0.31, 0.31, 0.32 والثانية 0.39, 0.4, 0.41 بين الأيام 15، 25، 35 وأبدت المجموعة الثالثة والرابعة اختلافات معنوية ايضاً للمدة ذاتها حيث سجلت المجموعة الثالثة القيم التالية 0.27, 0.29, 0.31 بينما المجموعة الرابعة سجلت القيم 0.27, 0.27, 0.29 بالمقارنة مع مجموعة السيطرة.

معدل إصابة الأورين

يبين الجدول رقم (2) تأثير الإضافات العلفية على نسبة الإصابة بجرثومة الـ *S. enteritidis* في الأورين حيث سجلت مجموعة السيطرة الموجبة أعلى النسب وكانت النسبة الكلية لها 93.3% بمجموع 14/15 ، بينما كانت النسبة للمجموعة الثالثة 46.6% وبمجموع 7 / 15 ، أما المجموعة الرابعة فنسبتها الكلية كانت 26.6% بمجموع كلي يساوي 4/15 ، بينما لم تسجل مجموعة السيطرة السالبة اي اصابة وبفروقات معنوية بين كل المجاميع.

معدل طرح الجرثومة

يوضح الجدول رقم (3) مدى تأثير الإضافات العلفية على معدل طرح جرثومة الـ *S. enteritidis* حيث سجلت مجموعة السيطرة الموجبة اعلى النسب في معدل طرح الجرثومة طوال مدة التجربة وكانت النسبة الكلية لها 73.3% وبمجموع كلي قدره 15/11 اما النسبة الكلية لكلاً من المجموعة الثالثة والرابعة فقد سجلت نسبة 33.3% بمجموع 15/5 و 26.6% بمجموع 15/4 على التوالي بينما لم تسجل مجموعة السيطرة السالبة اي نسبة طرح وبفروقات معنوية بين كل المجاميع.

المعايير الدمية

معدل عدد خلايا الدم البيض

الجدول(3): مدى تأثير الإضافات العلفية على معدل الطرح الجرثومي (Shedding rate)

العمر بالأيام المجاميع	40 يوم	33 يوم	26 يوم	19 يوم	12 يوم	الكلي
1م	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	15/0a (0%)
2م	3/1	3/2	3/2	3/3	3/3	15/11b (73.3%)
3م	3/0	3/1	3/1	3/1	3/2	15/5c (33.3%)
4م	3/0	3/0	3/1	3/1	3/2	15/4d (26.6%)

تدل الحروف الصغيرة على القراءة الإحصائية العمودية بين المجاميع ، تدل الحروف المتشابهة على عدم وجود فروق إحصائية معنوية بين المعاملات في حين تدل الحروف المختلفة إلى وجود فروق معنوية تحت مستوى احتمالية ($P < 0.05$)

الجدول(2): مدى تأثير الإضافات العلفية على نسبة الإصابة في الأورين Infection rate

العمر بالأيام المجاميع	40 يوم	33 يوم	26 يوم	19 يوم	12 يوم	الكلي
1م	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	15/0a (0%)
2م	3/2	3/3	3/3	3/3	3/3	15/14b (93.3%)
3م	3/0	3/1	3/1	3/2	3/3	15/7c (46.6%)
4م	3/0	3/0	3/1	3/1	3/2	15/4d (26%)

الجدول (5): تأثير الإضافات الغذائية على نسبة خلايا الهتروفيل / اللمفوسايت (H / L Ratio)

العمر بالأيام المجاميع	35 يوم	25 يوم	15 يوم
1م	0.31±0.01Aa	0.31±0.01Aa	0.32±0.02Aa
2م	0.39±0.01Ba	0.4 ± 0.02Ba	0.41±0.01Ba
3م	0.27±0.01Cdb	0.29±0.007ACab	0.31±0.01Aa
4م	0.27±0.02Cda	0.27± 0.014Aca	0.29±0.02Aa

تدل الحروف الكبيرة على القراءة الإحصائية العمودية بين المجاميع ، في حين تدل الحروف الصغيرة على القراءة الإحصائية الأفقية بين الأوقات وتدل الحروف المتشابهة على عدم وجود فروق إحصائية معنوية بين المعاملات في حين تدل الحروف المختلفة إلى وجود فروق معنوية تحت مستوى احتمالية ($P < 0.05$).

الجدول (4): تأثير الإضافات الغذائية على عدد كريات الدم البيض (WBC Count)

العمر بالأيام المجاميع	35 يوم	25 يوم	15 يوم
1م	15.97±0.02Aa	15.85±0.03Aa	15.71±0.18Aa
2م	13.53±0.38Bc	17.45±0.05Bb	16.31±0.05Ba
3م	20.18±0.62Ca	20.44±0.7CDa	19.3± 0.09Ca
4م	21.21±0.32Cb	20.16±0.02CDa	19.73±0.07Ca

المناقشة

جراثيم *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *klebsella* وتُفسر ميكانيكية العمل من خلال وجود المواد العنصرية (التانينات) والمركبات الفينولية Polyphenol في قشور الرمان التي تملك قابلية على ترسيب البروتينات الموجودة في الغشاء الخلوي أو في داخل الخلية الحية عند تناؤها من خلال الغشاء وتكوين أو اصر هيدروجينية بين مجاميع الهيدروكسيل الفينولية الحرة والمتعددة والمركبات النيتروجينية أو البروتينات وبالتالي تثبط بعض الأنزيمات الضرورية للبقاء مما يؤدي الى قتلها ، أو ربما يؤثر على الغشاء البلازمي مغيراً بذلك خواصه الوظيفية مما يؤدي الى تثبيط نمو الجراثيم (31) كذلك تحتوي قشور الرمان على مركبات الفلافونيدات Flavonoids وإيلاجك اسيد Ellagic acid والتي لها تأثير قاتل على الجراثيم (8). أما عامل الحماية فقد بينت النتائج للمجموعة الثالثة والرابعة ان كل من مزيج الاحماض العضوية وقشور الرمان قد وفرت مستوى حماية عالية ضد الخمج التجريبي بالسالمونيلا في نهاية التجربة ، مع تفوق مزيج الاحماض العضوية خلال فترة التجربة وهذه النتيجة تتفق مع الباحث (15). أوضحت نتائج الدراسة كفاءة جيدة لكل الإضافات العلفية في تقليل الإصابة بجراثيم السالمونيلا في أفراخ اللحم حيث يمكن ملاحظة نسبة عزل السالمونيلا في المساحة المجمعية معدل طرح السالمونيلا الجدول (3) ونسبة عزل السالمونيلا من محتويات الأعورين معدل نسبة الإصابة الجدول (2) أن معاملة الأفراخ بهذه الإضافات العلفية أدى الى تقليل نسبة الإصابة وليس المنع التام لحصول الإصابة حيث نلاحظ وجود نسبة إصابة ضمن المجاميع المعاملة رغم أنها منخفضة في المجموعة الثالثة والرابعة وقد أشار عدد من الباحثين الى هذه الحقيقة بأنه لا يمكن بأي حال ان يتم التخلص نهائياً من السالمونيلا باستخدام الإضافات العلفية لها ولكن يتم تقليلها الى مستويات منخفضة ومعنوية (33,32,26) وهذا ما بينته هذه الدراسة وبالتالي فإن هذا الانخفاض سوف ينعكس على قلة أنتشار السالمونيلا بين الأفراخ وهذا ما يشير إليه الباحث (26) كما يجب أن لا نغفل أنه ربما حتى باستخدام الإضافات العلفية المضادة فقد لا تؤثر بصورة كبيرة على نسبة الإصابة بالسالمونيلا فبرغم المعاملة تبقى نسبة الإصابة عالية خصوصاً لو رافقت الحالة أجهاد الطير نتيجةً للإدارة غير الجيدة أو الإصابة ببعض الأمراض (26) لكن وبصورة عامة ان تقليل مستوى طرح السالمونيلا في الأفراخ له أهمية كبيرة أيضاً في تقليل مستويات التلوث البيئي والتلوث عند الجزر والتصنيع وهذا ما يؤكد كل من الباحثين (34, 35, 36) مما يؤدي الى تقليل نسبة حدوث حالات التسمم الغذائي في الإنسان. كما أن النتائج قد بينت استمرار طرح أعداد قليلة من السالمونيلا ولغاية نهاية التجربة بعمر 40 يوم للمجموعة الثانية وربما يدل هذا على استمرار حالة الحمل الجرثومي بسبب بقاء أعداد قليلة من الجرثومة في الخلايا البلعمية في الطحال وهذا يعني بقاء الإصابة رغم قلة أو اختفاء العلامات السريرية على الطيور (37). أظهرت النتائج ارتفاع العدد الكلي لخلايا الدم البيض معنوية في مجموعة السيطرة ومن ثم الانخفاض المعنوي في اليوم 35 من التجربة وربما تكون الزيادة في أعداد خلايا الهيتروفيل

أجريت العديد من الدراسات حول العالم بخصوص بدائل المضادات الحيوية المستخدمة في الدواجن لغرض منع أو تقليل الإصابة بجراثيم السالمونيلا في الدجاج وكانت نتائج هذه الدراسات مختلفة وبينها فروقات ربما بسبب بروتوكول العمل أو طريقة التربية حقلية كانت أو مختبرية وأختلاف الفترات الزمنية للتجارب ، أن نتائج هذه الدراسة ربما تعد تطبيقية من الجانب العملي لما أظهرت من نتائج يمكن تطبيقها على مستوى الواقع الحقل. أظهرت نتائج الزرع الجرثومي على وسط الكروم نمو جراثيم السالمونيلا على شكل مستعمرات دائرية لزجة القوام ذات لون وردي مائل الى البنفسجي وأن هذه النتيجة متفقة مع كل من الباحثين (22, 23) ويعد وسط الكروم وسط عالي التخصص يُميز مستعمرات جراثيم السالمونيلا من خلال اللون الوردي والمائل إلى اللون البنفسجي (Mauve) وهو مختصر للوقت والفحوصات البايوكيميائية (24). أن نتائج الدراسة الحالية بينت ان أعداد السالمونيلا/غم من محتويات الأعورين للمجموعة الثانية (السيطرة الموجبة) كانت أعلى بكثير من مجموعتي المعاملة بالإضافات الغذائية وطيلة التجربة وقد أستمرت هاتين المجموعتين بالانخفاض على مدى تقدم العمر ولكن يجب أن نبين بأن مجموعة السيطرة كانت أيضاً في انخفاض مستمر وقد يعود هذا ربما الى تطور الفلورا المعوية وحصول التنافس على مستقبلات الالتصاق كما ذكره الباحث (25) لكن مع ذلك بقيت أعلى من مجاميع المعاملة الغذائية. بالنسبة لأستخدام الأحماض العضوية فإن هذه النتائج تتفق مع نتائج الباحثين (26) الذين استخدموا خليط الأحماض العضوية في أختزال اعداد جراثيم السالمونيلا والعصيات القولونية *E. coli* والتي بدت أكثر فعالية من المضاد الحيوي Eromycin الذي خفض أعداد هذه الجرثومة ولكن بنسبة أقل من الأحماض العضوية واتفقت كذلك مع ما توصل اليه (27) في الحد والتقليل من أعداد البكتيريا المعوية مثل *S. enteritidis* و *E. coli* وقد يعود سبب ذلك الى آلية عمل الحوامض العضوية في دخولها إلى داخل الخلية الجرثومية و تدمير غشاء الخلية وتثبيط التفاعلات الأيضية المهمة مثل تثبيط عملية تحلل الكلايوجين glycolysis بالإضافة الى تعبير الأس الهيدروجيني داخل الخلية الجرثومية (28) وكذلك خفض الاس الهيدروجيني للأمعاء وقد تساهم كل هذه الامور مجتمعة في إعادة توازن الفلورا المعوية في الأمعاء مما يقلل فرص استيطان جراثيم السالمونيلا. أما بخصوص قشور الرمان فقد اتفقت نتائج هذه الدراسة في تأثير قشور الرمان المضاد على الجراثيم المرضية مع الباحثون (7) ، الذين استخدموا مستخلص قشور الرمان على عزلتين من البكتيريا السالبة *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* وعزلتين من البكتيريا الموجبة *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* ومع الباحثين (29) الذين استخدموا مستخلص قشور الرمان ضد ثلاث عتر من الجراثيم *Staphylococcus aureus* , *Pseudomonas aeruginosa* , and *Salmonella* كبديل عن استخدام كل من البنسلين او الستربتومايسين Streptomycin او النيتروكزولين Nitroxolin ، وبينت نتائج الباحث (30) فعالية مماثلة لقشور الرمان ضد

قياس نسبة خلايا H / L تعتبر من المؤشرات العالمية للحالة الصحية الحقيقية ، حيث أن ارتفاع هذه النسبة يشير الى حدوث حالة الأجهاد وأن انخفاض نسبتها دليل على الظروف الصحية الجيدة للتربية وعدم حدوث أي عوامل أجهاد للطير لأن الأجهاد يعمل على تحفيز الغدة الكظرية وزيادة إفراز هرمونات خاصة مثل هرمون الأستيرون القشراني الذي له تأثير مباشر في تحلل الخلايا اللمفية المنتجة من الاعضاء اللمفاوية (41) ، الذي بدوره ينتج زيادة في الخلايا المتغيرة مما يؤدي الى ارتفاع قيمة L / H حيث بينت نتائج هذه الدراسة وجود تسليط نوع من الاجهاد على المناعة نتيجة الخمج الجرثومي لان الإصابة بالسالمونيلا بحد ذاتها تسبب استنفاد او نضوب للخلايا اللمفاوية ، ومن ناحية اخرى يجب ان نعلم ان زيادة خلايا المغايرات تلعب دور مهم في زيادة مقاومة الافراخ المصابة ضد السالمونيلا لكفاءتها البلعمية العالية (42).

سبباً في ارتفاع خلايا الدم البيض كأستجابة للمخلفات الجرثومية (38) ، بينما يؤكد (13) حصول ارتفاع أعداد الخلايا اللمفية والبلعمية بعد الإصابة التجريبية بجراثيم *Salmonella enteritidis* ، كما أظهرت النتائج الارتفاع المعنوي في أعداد خلايا الدم البيض في مجاميع المعاملة مقارنة بمجموعة السيطرة الموجبة ومجموعة السيطرة السالبة فقد يكون بسبب تحفيز الجهاز المناعي وأنتاج الأنواع المختلفة لخلايا الدم البيض (39) ، وأن هذه النتائج تتفق مع ما توصل إليه الباحثان (40) اللذان أستخدما مستخلصات نباتية في تغذية فروج اللحم أذ توصلا في نتائجهما الى حصول زيادة معنوية في العدد الكلي لخلايا الدم البيض وبشكل خاص الخلايا اللمفية التي أقتربت بزيادة معدلات الكلوبولينات المناعية وخصوصاً نوع بيتا وكاما. أظهرت نتائج نسبة خلايا المغايرات الى الخلايا اللمفاوية H / L ارتفاع معنوي في هذه النسبة في مجموعة السيطرة مقارنة مع المجموعة الأولى ومجموعتي المعاملة ، أن

المصادر

- pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate J Nutr Biochem 16:360-367 .
- 9-Amani S, Al-Rawahi I, Giles Edwards, Mohammed Al-Sibani, Ghanim Al-Thani, Ahmed S, Al-Harrasi, Mohammed Shafiur Rahman (2014) Phenolic Constituents of Pomegranate Peels (*Punica granatum L.*) Cultivated in Oman European Journal of Medicinal Plants 4(3): 315-331.
- 10-Marteau P, Cuillierier E, Meance S, Gerhardt MF, Myara A, Bouvier M, Bouley C, Tondu F, Bommelaer G, Grimaud JC (2002) Bifidobacterium animalis strain DN-173shortens the colonic transit time in healthy women: a double-blind randomized controlled study. Aliment pharmacol. Ther 16:587-593.
- 11-علي ومجيد ، أمنة محمد ، شهباء حميد (2010) التأثير المثبط لمستخلص قشور الرمان أتجاه بعض الأعفان الجامعة المستنصرية / مجلة كلية التربية الأساسية قسم العلوم .العدد63.
- 12-Lara E, Vaughn Peter SHolt, Richard K Gast (2008) Cellular Assessment of Crop Lymphoid Tissue from Specific-Pathogen-Free White Leghorn Chickens After *Salmonella Enteritidis* Challenge Avian Dis. 52:657-664.
- 13-النابلي ، خليل كزار جلاب (2014) التأثيرات السمية المناعية المرضية الجينية لثالث أوكسيد الزرنيخ في الجردان الممنعة المخمجة بجرثومة السالمونيلا تايفيميريوم والمحمية بحامض الفالبيوبك . أطروحة دكتوراه / كلية الطب البيطري -جامعة بغداد.
- 14-Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR (2004) Clinical Veterinary microbiology .6th edition. Wife pulshing, Mosby –year Book Inc. Europe Limited ;P:61-64.
- 15-Abdul Aziz H, Muhsen F, Sabar H, Ali (2007) Comparison of the efficacy of dietary lactose and administration via drinking water to reduce *Salmonella* colonization in broiler chickens. Sci. J. Vet. Med. 6 ; 1 : 43-49.
- 16-Campbell TW (1988) Avian Hematology and Cytology. First Edition low state University Press Ames, Iowa, USA.
- 1-Callaway TR, Edrington TS, Anderson RC, Byrd JA, Nisbet DJ (2008) Gastrointestinal microbial ecology & the safety of our food supply as related to *salmonella* j. of American society of animal science 86(E. suppl)E163-E172.
- 2-Paterson PH, Love BC, Shaw DP (2009) Probiotic/Antibiotic shuttle programs for *salmonella* reduction in commercial leghorn. Penn. State; Coll. of Agri. Sci. Poult. Sci.
- 3-Kimura AC, ReddyV, Marcus R, Cieslak PR, Mohle-Boetani JC, Kassenborg HD, Segler SD, Hardnett FP, Barrett T, Swerdlow DL (2004) Chicken consumption is a newly identified risk factor for sporadic *salmonella enteric* serotype *enteritidis* infections in the united states ; A control study in food net sites. Clin. Infect. Dis. 38: S244-S252.
- 4-Kottwitz LBM, Oliveira TCRM, Alcocer I, Farah SMSS, Abrahao WSM, Rodrigues DP (2010) Avalicao epidemiological de surtos de salmonelose ocorridos no periodo de 1999 a 2008 no estado do Parana , Brasil . Acta Scientia 32 :9-15.
- 5-Hald T, Vose D, Wegener HC, Koupeev T (2004) A Bayesian Approach to Quantify the Contribution of Animal-Food Sources to Human Salmonellosis. Risk Analysis. 24: 1, 255-269.
- 6-Robert G (2007) The use of protected organic acids (galliacid) & a protease enzyme(poultry grow250) in poultry feeds. Alinat Colombia ltda & jefolatino America ltda, jefo Nutrition Inc.
- 7-Fawole A, Nokwanda P, Makunga, Umezuruike Linus Opara (2012) Antibacterial, antioxidant and tyrosinase-inhibition activities of pomegranate fruit peel methanolic extract, BMC Complementary and Alternative Medicine,12:200 <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/12/200>.
- 8-Secram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, Heber (2005) Invitro anti-proliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total

- 31-Sumner MD, M Elliott, GW eidner, JJ Daubenmier, MH chew, R Marlin, CJ Raisin, D,Ornish (2005) Effect of pomegranate juice consumption myocardial perfusion in patients with coronary heart disease. Am J. cardio 96 :810,814.
- 32-Chadfield MS, Hinton MH (2003) Evaluation of treatment and prophylaxis with nitrofurans and comparison with alternative antimicrobial agents in experimental *Salmonella enterica Serovar enteritidis* infection in chicks. Veterinary Research Communications. 27:257-273
- 33-Higgins GFSE, Erf JP, Higgins SN, Henderson AD, Wolfenden G, Gaona-Ramirez, BM Hargis (2007) Effect of Probiotic Treatment in Broiler Chicks on Intestinal Macrophage Numbers and Phagocytosis of *Salmonella Enteritidis* by Abdominal Exudate Cells. Poultry Science 86:2315–2321.
- 34-Rasschaert G, Houf Godard C, Wildemaue C, Pastuszczak-Frak M, De Zutter (2008) Contamination of carcasses with *Salmonella* during poultry slaughter. J food Prot 71: 146-152.
- 35-Fratamico FM (2003) Comparison of culture, polymerase chain reaction, TaqMan *Salmonella*, and *TtransiaCard Salmonella* assay for detection of *Salmonella SPP.* in naturally-contaminated ground chicken, ground turkey, and ground beef. Mol Cell probes 17; 215-221.
- 36-Doyle MP, Erickson MC (2006) Reducing the carriage of food-borne pathogens in livestock and poultry. Poultry Sci 85: 960-973.
- 37-Wigley P, Berchieri Jr, A Page, KL Smith, AL, Barrow PA (2001) *Salmonella enterica* serovar *pullorum* persists in splenic macrophages & in the reproductive tract during persistent, disease-free carriage in chickens infect. Immunol., 69:7873-7879.
- 38-Kramer BW, Moss TJ, Willet KE, Newham JP, gami M, Sly PD, Kallapur SG, Ikegmi M, Job AH (2001) Dose and time response batter intra amniotic endotoxin preterm lambs. Am. Respir. Crit. Care. Med. 164 (6):982 -988.
- 39-Seyedeh Ameneh Naseri Alavi, Afshin Zakeri, Behnam Kamrani, Yaser Pourakbari, (2012) Effect of Prebiotics, Probiotics, Acidfire, Growth Promoter Antibiotics and Synbiotic on Humoral Immunity of Broiler Chickens Global Veterinaria 8 (6): 612-617.
- 40-Eisa AMA, Abdel El-Hamied S (2003) Clinico pathological studies on Bio-stimulant Agent in broiler chicken. Kafer El - Sheikh Vet. Med .J. 1: 631 -644.
- 41-Abraham E, Carrmody A, Shenkar R, Arcaoli J (2000) Nutrophile as early immunologic effector in hemorrhage or endotoxiemia induce acute injury. Am. physio. lung cell Mol. , 279 (6); 11337 – 1145.
- 42-Kogut MH, Tellez G, McGruder IED, Hargis BM, Williams JD, Corrier DE, DeLoach, JR (1994) Heterophils are decisive components in the early responses of chickens to *Salmonella enteritidis* infections. Microb. Pathog.16:141-151
- 17-Shen PF, Atterson (1983) A simplified wright's stain for routine avian blood smear staining .Poultry. Sci.,62:923-924
- 18-Burton RR, CW, Guion (1968) The differential Leucocyte blood count: its precision and individuality in the chicken. Poultry sci.47:1945-1949.
- 19-الراوي ، خاشع محمود وخلف الله ، عبد العزيز محمد (2000) تصميم وتحليل التجارب الزراعية ، دار الكتب للنشر ، جامعة الموصل . العراق .
- 20-Leech NL, Barrett KC, Morgan GA (2011) IBM SPSS For Intermediate statistics. 4th ed. Taylor and Francis Group . LLC.USA.
- 21-SAS. Institute (2004) SAS Users Guide: statistics . Release 9 .1. SAS Inst .Inc
- 22-Huff GR, WE Huff, S Jalukar, J Oppy, NC. Rath, B Packialashm (2013) The effects of yeast feed supplementation on turkey performance and pathogen colonization in a transport stress/*Escherichia coli* challenge. Poult. Sci. 92:655-662.
- 23-Wolfenden RE, NR Pumford, MJ Morgan, S Shivaramaiah, AD Wolfenden, CMPixley, J Green, G Tellez, BM Hargis Pixley (2011) Evaluation of selected direct-fed microbial candidates on live performance and *Salmonella* reduction in commercial turkey brooding houses. Poult. Sci. 90:2627-2631.
- 24-Vonderzant C, Splittstoesser DF (2004) Compendium of methods for microbiological Examination of foods(APHA), 36: 605-609.
- 25-Park SH, I Hanning, A Perrota, BJ Bench, E Alm, SC Ricke (2013) Modifying the gastrointestinal ecology in alternatively raised poultry and the potential for molecular and metabolomic assessment. Poult. Sci. 92:546 .-561.
- 26-Hassan HM, A Mohamed, Amani W Youssef, Eman R, Hassan (2010) Effect of Using Organic Acids to Substitute Antibiotic Growth Promoters on Performance and Intestinal Micro flora of Broilers Asian-Aust. J. Anim. Sci. Vol. 23, No. 10: 1348 - 1353 October 2010.
- 27-Hahn Dana L, "The Effects of Feed Additives, Housing Systems, and Stress on *Salmonella* Shedding in Single Comb White and Brown Laying Hens" (2014) Theses and Dissertations in Animal.
- 28-Brul S, Coote P(1999) Preservative agents in foods mode of action & microbial resistance mechanism . Intl. J. Food Microbiol., 50:1-17.
- 29-Rabah Chadli, Aman Bouzird, Khadidja Bouzid, Hamida Nader (2015) Bactriacidal effect of aqueous extract of the Bark of the pomegranate peel (*Punica granatum*) on bacteria. Journal of Molecular Biotechnology Has been issued since 2013. 7;1: 4-11.
- 30-تركى ، أحمد محمد ، حماد نواف فرحان ، أشواق طالب حميد (2009) الفعالية التثبيطية لمستخلصات قشور الرمان *Punica granatum* تجاه البكتيريا المرضية المعزولة من الأمعاء والمعدة في الإنسان . مجلة جامعة الأنبار للعلوم الصرفة . المجلد الثالث ، العدد الثاني 1991- 8941