

## تتمية جراثيم السالمونيلا المعوية النمط المصلي تايفيموريوم في اجنة بيض الدواجن

عمار محمود العالم، سمية ياسين الدباغ، هيفاء حسين الخزعلي ومزاحم ياسين العطار

فرع الاحياء المجهرية، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل، العراق

(الاستلام ٢ أيار ٢٠١٨؛ القبول ٨ أيلول ٢٠١٨)

### الخلاصة

تضمنت الدراسة حقن جراثيم *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* المعزولة من الزرايزر في اجنة بيض الدجاج. قسم البيض الى ثمانية مجاميع في كل مجموعة ستة بيضات، حقنت المجموعتين الأولى والثانية بالمحلول الفسلجي المعقم في الغشاء المشيمي اللقائي وكيس المح وعلى التوالي كسيطرة سالبة، وحقنت المجموعتين الثالثة والرابعة بالمعلق الجرثومي بالتركيز  $10^4$  ml/cfu على الغشاء المشيمي اللقائي وكيس المح على التوالي، فيما حقنت المجموعتين الخامسة والسادسة بالتركيز  $10^6$  ml/cfu على الغشاء المشيمي اللقائي وكيس المح واخيرا حقنت المجموعتين السابعة والثامنة بالتركيز  $10^8$  ml/cfu على الغشاء المشيمي اللقائي وكيس المح على التوالي كمجموعة سيطرة موجبة. اظهرت النتائج حصول اعلى نسبة هلاكات للاجنة  $100\%$  بالمجموعة السادسة بعد مرور ٩٦ ساعة من الحقن، كما شوهد ارتفاع ملحوظ باعداد الجراثيم بازدياد وقت التحضين بلغت اعلى نسبة  $8,19 \log_{10}$  و  $8,26 \log_{10}$  لو ١٠ بعد مرور ٩٦ و ١٤٤ ساعة في المجموعة السادسة، بينما وصل اعلى عدد للعزل الجرثومي  $7,04 \log_{10}$  و  $6,31 \log_{10}$  لو ١٠ بالمجموعتين الثالثة والرابعة بعد مرور ٤٨ و ٩٦ ساعة من الحقن على التوالي. بينت نتائج التحليل الاحصائي وجود فرق معنوي لاعداد الجراثيم بعد ٢٤ ساعة من الحقن وبكلا التركيزين مقارنة مع اوقات التحضين الأخرى، كما لوحظ وجود علاقة معنوية بين كمية الجرعة المستخدمة وامراضية الجرثومة. خلصت الدراسة الى ان جراثيم السالمونيلا المعزولة من الزرايزر ادت الى حدوث تغيرات مرضية واثرت على نسبة الفقس في بيض الدجاج المخصب.

## Propagation of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* in embryonated chicken egg

A.M. Al-Aalim, S.Y. Al-Dabbagh, H.H. Al-Khazaaly and M.Y. Al-Attar

Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq  
\*ammarmahmmmod@yahoo.com

### Abstract

The study included the injection of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* isolated from starlings bird in embryonated chicken eggs. The eggs were divided into eight groups, each group contain 6 eggs. The G1 and G2 groups were injected with the sterile normal saline solution in the choriaallantoic membrane (CAM) and yolk sac as negative control. The group G3 and G4 injected by bacterial suspension at a concentration of  $10^4$  cfu/ml in the CAM and yolk sac while the G5 and G6 injected with bacterial concentration  $10^6$  cfu/ml in the CAM and yolk sac respectively. Finally, the G7 and G8 groups were injected with  $10^8$  cfu/ml of bacterial suspension in the CAM and yolk sac respectively. The results showed that the highest percentage of death in eggs embryos was 100% in the sixth group after 96 hours of injection. There was also a significant increase in the number of bacteria in correlation with time of incubation. The highest rate of bacterial isolate was  $8,19 \log_{10}$ ,  $8,26 \log_{10}$  after 96 and 144 hours in the sixth group, while the highest number of bacterial isolates was  $7,04 \log_{10}$  and  $6,31 \log_{10}$  in the third and fourth groups after 48 and 96 hours of injection respectively. The results of the statistical analysis showed a significant difference in the number of bacterial isolate after 24 hours of injection in both concentrations compared to other incubation times. A significant relationship was also found between the amount of the dose used and the bacterial disease. this study concluded that *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* isolated from starlings can cause pathological changes and effect on hatchery percentage in embryonated chicken eggs.

Available online at <http://www.vetmedmosul.com>

## المقدمة

نشطت الجراثيم بزرعها في انابيب حاوية على مرق نقيع القلب والمخ (Oxiod) Brain Heart Indusion broth وحضنت في ٣٧ م لمدة ٢٤ ساعة ثم لقت الاوساط الانتخابية الصلبة وهي وسط السالمونيلا الشايكلا اكار Salmonella Shigella agar (Oxiod) واكار الاخضر للماع Brilliant Green agar باستخدام عروة الزرع المختبري وحضنت الاطباق في ٣٧ م لمدة ٢٤ ساعة، تم اختيار خمسة مستعمرات جرثومية وزرعت في انابيب المرق المغذي (Oxoid) Broth Nutrient وحضنت في ٣٧ م لمدة ٢٤ ساعة، وفورنت عكارة الانابيب مع عكارة انابيب ماكفرلاند وتم اختيار الانبوب المكافئ للتركيز الجرثومي  $10^8$  cfu/ml (١٢) لغرض عمل تخافيف عشارية لمعايرة الجرعة واختيرت الانابيب المكافئة للتركيز الجرثومي  $10^4$  و  $10^6$  cfu/ml لغرض حقن البيض المخصب (١٣-١٦).

## تصميم التجربة

البيض المخصب وطرق الحقن : استخدمت ٤٨ بيضة مخصبة مجهزة من شركة الامين في الموصل وحضن البيض في حاضنة البيض في درجة ٣٧ م وبرطوبة ٦٠-٧٠ % (١٧)، وتم استبعاد الاجنة الميتة لغاية اجراء التجربة. قسم البيض الى ثمانية مجاميع كل منها حاوية على ستة بويضات حقنت المجموعة الاولى والثانية بمحلول الملح الفسلي المعقم في الغشاء اللقائقي المشيمي وكيس المح على التوالي عدت مجاميع سيطرة سالبة، وحقن البيض في المجموعة الثالثة والرابعة بالمعلق الجرثومي بتركيز  $10^4$  cfu/ml على الغشاء اللقائقي المشيمي وفي كيس المح على التوالي، بينما حقنت المجموعة الخامسة والسادسة بمعلق الجراثيم بتركيز  $10^6$  cfu/ml على الغشاء اللقائقي المشيمي وفي كيس المح على التوالي واخيرا حقنت المجموعتين بالمعلق الجرثومي بتركيز  $10^8$  cfu/ml في الغشاء اللقائقي المشيمي وكيس المح وعدت مجاميع سيطرة موجبة (جدول ١).

## الحقن في كيس المح

عقم مكان الحقن باستخدام الكحول ٧٠٪ بعد تحديده باستخدام جهاز الكاندلر وحقن البيض المخصب عند وصول عمر الجنين الى سبعة ايام ب ٠,١ مل من المعلق الجرثومي بتركيز  $10^4$  و  $10^6$  و  $10^8$  cfu/ml وذلك باستخدام محقنة بحجم ١ مل. ادخلت الابرة من منطقة الفسحة الهوائية وبشكل مواز للمحور الطولي للبيضة وتم التأكد من وصولها الى كيس المح بسحب المكبس ليظهر القليل من المح، تم حقن المعلق الجرثومي وغلق الفتحة باستخدام شمع البارفين واعيد البيض الى الحاضنة (١٣).

## الحقن على الغشاء اللقائقي المشيمي

استخدم البيض المخصب الحاوي على اجنة بعمر ١١ يوم حيث عقم مكان الحقن باستخدام الكحول ٧٠٪ بعد تحديده باستخدام جهاز الكاندلر ولغرض الحقن على الغشاء اللقائقي

تعد جراثيم السالمونيلا احدى اهم الجراثيم الشائعة الانتشار في صناعة الدواجن، فضلا عن كونها احد اهم مسببات الامراض المحمولة بالغذاء الناتجة عن تلوث منتجات الدواجن والمنتشرة بشكل كبير في العالم (١-٣). تتواجد ثلاثة انواع رئيسية من السالمونيلا في الدواجن وهي *S. enterica serovar typhimurium* و *S. enterica serovar gallinarum biovars gallinarum* و *S. enterica serovar gallinarum biovars pullorum* التي تنتمي الى جنس *S. enterica* (٤). تسبب هذه الانواع امراضا جهازية عديدة في الطيور وتتموضع الجراثيم في الاعضاء الداخلية مثل الكبد والكلية والمبايض وقناة البيض والطحال (٥). تتسم اصابة الافراخ حديثة الفقس بنسبة الهلاكات العالية اضافة الى الانخفاض الشديد في نسب فقس البيض المصاب فضلا عن ضعف النمو في الافراخ الحية حديثة الفقس (٦،٧).

تتواجد ايضا *S. enterica serovar typhimurium* في قطعان الدجاج البياض وتعد احدى الملوثات الخارجية للبيض الناتج، وتزايدت اهميتها في الاعوام الاخيرة وذلك لارتباطها مع الاندلاعات الممرضة الناتجة عن تلوث مكونات البيضة (٣). تنتقل جراثيم السالمونيلا الى البيض بوساطة الانتقال العمودي او الافقي حيث تنتقل اما عن طريق الجهاز التناسلي (١،٥،٨). عن طريق التلوث البرازي للبيضة بعد وضع البيض في الاعشاش (٨،٩). تلعب قشرة البيضة الرقيقة والرطوبة والدافئة دورا اساسيا في اختراق جراثيم السالمونيلا لاغشية البيضة (٢،٥،٩)، وخصوصا خلال الدقائق والساعات الاولى بعد وضع البيضة (٢). وبعد اختراق جراثيم السالمونيلا لاغشية البيضة يصبح من الصعوبة السيطرة على انتقالها الى داخل مكونات البيضة الاخرى وبالتالي الى الاجنة النامية (٥،٨،١٠)، وتلعب الافراخ الفاقسة من هذا البيض دورا اساسيا في انتشار الاصابة الاقفية في المفاقس وذلك بالتماس بين الافراخ المصابة والافراخ السليمة الفاقسة حديثا (٥،٧).

ونظرا لاهمية جراثيم السالمونيلا الممرضة وانتشارها الواسع في المفاقس وتأثيرها في صناعة الدواجن هدفت الدراسة الحالية لمعرفة امكانية تنمية جراثيم السالمونيلا المعزولة من طيور الزراير في البيض المخصب وتأثيرها على اجنة بيض الدواجن مختبريا.

## المواد وطرائق العمل

### تحضير الجرعة المخمجة

استخدمت جراثيم *Salmonella enterica serovar typhimurium* المجهزة من مختبر الاحياء المجهرية، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل والمصنفة مصليا والمعزولة من الزراير من قبل (١١) لغرض انتاج الجرعة المخمجة.

انتهاء التجربة، حيث عقم سطح البيض واخذت العينات من كيس المح ومن السائل اللقائقي المشيمي اضافة الى جزء من الغشاء وعملت تخفيف عشارية من العينات وزرع طبقين من وسط الاكار المغذي من كل تخفيف وحضنت الاطباق في ٣٧ م لمدة ١٤ ساعة وتم عد المستعمرات النامية وتسجيل النتائج (١٦).

#### التحليل الاحصائي

حللت بيانات النتائج احصائيا باستخدام الحاسبة الالكترونية وباستخدام برنامج الاحصاء SPSS18.0 وتم مقارنة النتائج باستخدام اختبار دنكن عند مستوى معنوية  $P < 0.05$ .

#### النتائج

##### الفحص العياني

اظهر الفحص موت بعض الاجنة في كل من المجموع المحقونة في كيس المح والغشاء اللقائقي المشيمي وازدادت نسبة الهلاكات مع تقدم عمر حضن الجنين ليصل الى ١٠٠ و ٦٦,٤٪ خلال ٩٦ ساعة بعد الحقن في المجموعتين الثالثة والسادسة على التوالي (الجدول ٢)، عانت الاجنة النافقة في كافة المجموع من علامات التقزم والاحتقان مع ظهور احتقان ومواد تجبينية ونزف حبري شديد على الغشاء اللقائقي المشيمي مع نزف واحتقان وتحلل في كيس المح عند مقارنتها مع اجنة مجموعة السيطرة السالبة، اظهرت اجنة المجموعتين الثالثة والرابعة علامات مرضية اشد مقارنة بالمجموع الاخرى (الشكل ١). اما بالنسبة للمجموعتين السابعة والثامنة (سيطرة موجبة) فقد كانت نسبة الهلاكات ١٠٠٪ خلال اول ٢٤ ساعة من الحقن.

المشيمي تم عمل ثقب في منطقة الفسحة الهوائية وفتحة مثلثة في المنطقة الجانبية وتم تسليط ضغط سالب على البيضة في منطقة الفتحة الجانبية وتم تقطير ٠,١ مل من المعلق الجرثومي بتركيز ١٠ و ٦١٠ و ٨١٠ cfu/ml اغلقت الفتحتان باستخدام شمع البارافين واعيد البيض الى الحاضنة (١٨) كما مبين في الجدول ١، وسجلت النتائج خلال الايام اللاحقة للحضن وسجلت نسبة الهلاكات اضافة الى اخذ عينات من الاجنة النافقة لغرض العد الجرثومي.

الجدول ١: التركيز الجرثومي في البيض المخضب حسب المجموع المختلفة

المجموع	التركيز الجرثومي cfu/m	طريقة الحقن
الأولى	صفر	الغشاء اللقائقي المشيمي
الثانية	صفر	كيس المح
الثالثة	٤١٠	الغشاء اللقائقي المشيمي
الرابعة	٤١٠	كيس المح
الخامسة	٦١٠	الغشاء اللقائقي المشيمي
السادسة	٦١٠	كيس المح
السابعة	٨١٠	الغشاء اللقائقي المشيمي
الثامنة	٨١٠	كيس المح

عدد البيوض المخصبة في كل مجموعة هو ستة.

##### العد الجرثومي

اخذت عينات من الاجنة النافقة من كافة المجموع خلال فترة حضن البيض ٢٤، ٤٨، ٧٢، ٩٦، ١٢٠، ١٤٤ ساعة ولحين

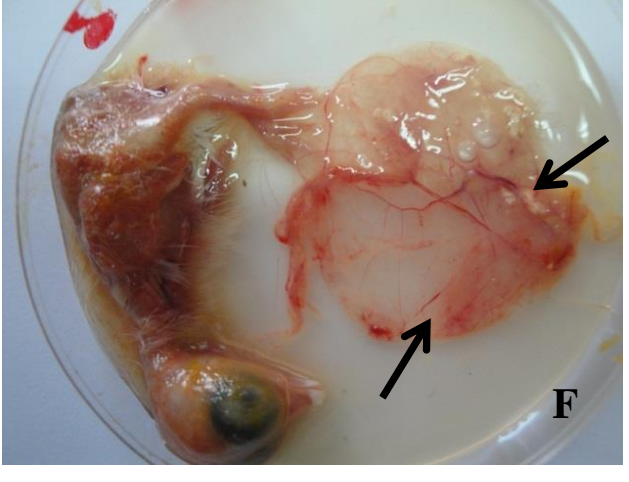
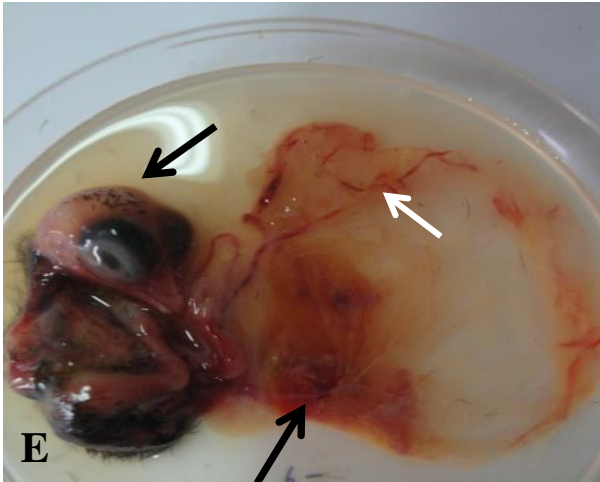
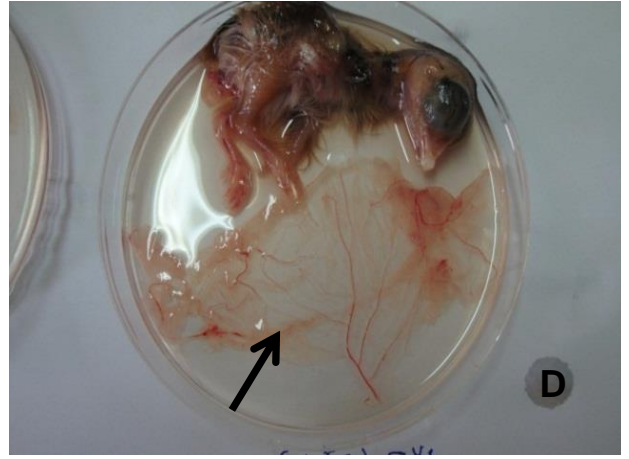
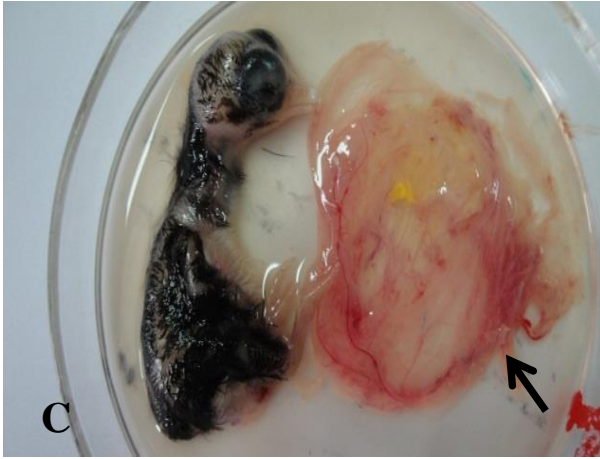
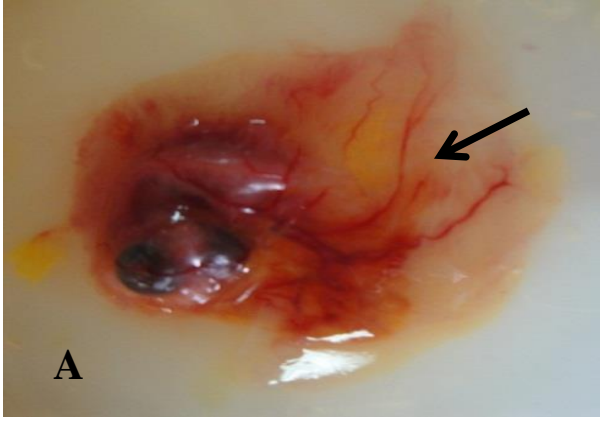
الجدول ٢: النسبة المئوية وعدد الهلاكات في اجنة بيض الدواجن

المجموع	٢٤ ساعة	٤٨ ساعة	٧٢ ساعة	٩٦ ساعة	١٢٠ ساعة	١٤٤ ساعة
الأولى	صفر	صفر	صفر	صفر	صفر	صفر
الثانية	صفر	صفر	صفر	صفر	صفر	صفر
الثالثة	صفر	٦/١ (١٦,٦٪)	٦/٢ (٣٣,٢٪)	٦/٤ (٦٦,٤٪)	٦/٥ (٨٣٪)	٦/٦ (١٠٠٪)
الرابعة	صفر	٦/١ (١٦,٦٪)	٦/٢ (٣٣,٢٪)	٦/٤ (٦٦,٤٪)	٦/٦ (١٠٠٪)	٠
الخامسة	صفر	٦/١ (١٦,٦٪)	٦/٢ (٣٣,٢٪)	٦/٣ (٥٠٪)	٦/٥ (٨٣٪)	٦/٦ (١٠٠٪)
السادسة	صفر	٦/١ (١٦,٦٪)	٦/٣ (٥٠٪)	٦/٦ (١٠٠٪)	صفر	صفر
السابعة	٦/٦ (١٠٠٪)	صفر	صفر	صفر	صفر	صفر
الثامنة	٦/٦ (١٠٠٪)	صفر	صفر	صفر	صفر	صفر

المجموعة الثالثة بعد مرور ٤٨ ساعة من الحقن و ٦,٣١ لو ١٠ في المجموعة الرابعة بعد مرور ٩٦ ساعة من الحقن (الشكل ٢)، وبينت نتائج التحليل الاحصائي وجود فرق معنوي لعزل الجراثيم بعد ٢٤ ساعة من الحقن مع بقية الاوقات ولكلا التركيزين المستخدمين على الرغم من الارتفاع اللوغارتمي لاعداد الجراثيم بالتزامن مع تقدم عمر الجنين (الشكل ٢).

##### العزل الجرثومي من اجنة بيض الدواجن

اظهرت نتائج العد الجرثومي لعينات البيض المحقونة ارتفاعا ملحوظا بعدد الجراثيم مقارنة مع الوقت حيث وصلت اعلى عدد للعزل الى ٨ لو ١٠ خلال ٩٦ ساعة بعد الحقن بينما كان ٨,٢٦ لو ١٠ اعلى عدد للعزل بعد ١٤٤ ساعة في افراد المجموعتين الخامسة والسادسة، بينما بلغ اعلى عدد للعزل ٧,٠٤ لو ١٠ في



الشكل ١: التغيرات المرضية في اجنة بيض الدواجن في المجاميع المختلفة. A: تحلل كيس المح بعد مرور ٢٤ من حقن الجنين بجرعة  $10^4$  cfu/ml في كيس المح. B: تقزم الاجنة مقارنة بمجموعة السيطرة بعد حقن الجنين بجرعة  $10^4$  cfu/ml في كيس المح. C, E: احتقان ونزف وتثخن الغشاء اللقائقي المشيمي مع احتقان الجنين بعد مرور ١٤٤ ساعة على حقن الجنين بتركيز  $10^4$  و  $10^6$  و  $10^8$  cfu/ml. D: الغشاء اللقائقي المشيمي لمجموعة السيطرة. F: وجود احتقان ونزف الحبري مع وجود مواد تجبنية على الغشاء اللقائقي المشيمي بعد مرور ١٢٠ ساعة على حقن الجنين بتركيز  $10^4$  cfu/ml على الغشاء اللقائقي المشيمي.

*typhimurium* المستخدمة في التجربة وامكانية تسببها بالهلاكات في اجنة بيض الدواجن جاءت نتائج الدراسة مقارنة لنتائج الهلاكات في اجنة بيض الدواجن ٨٠-١٠٠٪ التي حصل عليها (٢٢) بعد حقن جراثيم السالمونيلا في كيس المح، اذ تزداد نسبة الهلاكات مباشرة خلال ٩٦ ساعة اللاحقة لحقن الجراثيم (٢٣) وخالفت اعتقاد (١٢) ان نسبة جراثيم السالمونيلا العالية في البيض ليس لها تاثير على نسبة الفقس. عانت الاجنة النافقة من تغيرات عيانية متمثلة بالتقرم والنزف والاحتقان مع وجود النزف الحبري وظهور المواد التجبينية على الغشاء اللقائقي المشيمي واحتقان كيس المح وهذا مطابق لما سجله كل من (٢٠،٢٢).

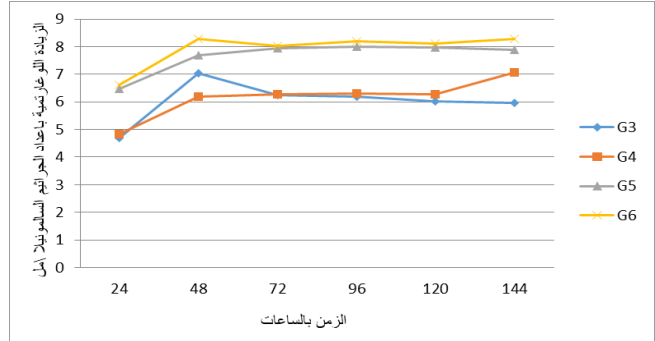
وبدراسة العزل الجرثومي لوحظ زيادة في اعداد جراثيم *Salmonella enterica serovar typhimurium* المحقونة مع الوقت وبمستوى معنوي خلال اول ٢٤ ساعة بعد الحقن مع استمرار ازدياد اعدادها في كافة مجاميع البيض المحقون لتصل الى ٨ لو ١٠ و٢٦، ٨ لو ١٠ خلال ٩٦، ١٤٤ ساعة بعد الحقن لكون البيض وسط غذائي ملائم جدا لنمو الجراثيم (٢٠،٢٤) وخصوصا في كيس المح حيث يحدث التكاثر السريع في داخله لوفرة المواد المغذية (٢٥،٢٦) وعلى الرغم من كون كيس المح حاوي على العديد من الاجسام المضادة الا انها ليس لها دور في الحد من التكاثر السريع للجراثيم داخل كيس المح (٢٧) حيث تتكاثر الجراثيم عند حقنها بالقرب من كيس المح بشكل كبير خلال فترة ٢٤ ساعة (٢٨) وقد وجد ان المواد المغذية التي تتواجد في كيس المح تحفز تعبير جينات الضراوة gene expression المتواجدة في جراثيم السالمونيلا مما يساعد على فوعة الجرثومة (٢٩).

لم يلاحظ وجود زيادة ملحوظة باعداد الجراثيم في مجاميع البيض المحقونة على الغشاء اللقائقي المشيمي عند مقارنتها بمجاميع البيض المحقون في كيس المح على الرغم من ان الغشاء اللقائقي المشيمي يعد وسط مناسب لتنمية الجراثيم (١٨) الا انه قد يفتقر الى بعض المواد المتواجدة في كيس المح والتي تعزز من نمو الجراثيم الا ان جراثيم السالمونيلا بمقدورها النمو في اي منطقة من البيض لامتلاكها نواقل siderophorus والتي تعمل على جلب المواد المغذية وبالاخص الحديد الى الجرثومة (٢٦،٣٠) كما تلعب عوامل الضراوة الجرثومية الاخرى كالاهداب دورا مهما في تعزيز النمو الجرثومي في البيض (٣١،٣٣) ولهذا لم يلاحظ وجود فرق معنوي بين مناطق الحقن.

اشارت النتائج الى وجود فرق معنوي بين تركيز الجرعة المستخدمة ٤١٠ و ٦١٠ cfu/ml وشدة الامراضية في كلا المنطقتين المستخدمتين بالحقن حيث ازدادت اعداد الجراثيم المعزولة وشدة امراضيتها بزيادة التركيز (٢٠،٣٣،٣٤).

وخلصت الدراسة الحالية الى امكانية نمو جراثيم *Salmonella enterica serovar typhimurium* المعزولة من الزرايز في بيض الدجاج المخصب وامكانية تسببها بافات مرضية وهلاكات في اجنة البيض وذلك لفوعة الجرثومة اضافة الى تاثيرها على نسبة الفقس.

عند دراسة النتائج المستحصلة من التجربة لوحظ وجود فروق معنوية بين تركيز الجرعة المستخدمة في الحقن واعداد الجراثيم المعزولة من البيض وشدة الامراضية (جدول ٣).



الشكل ٢: اعداد جراثيم السالمونيلا المعزولة من المجاميع المختلفة مقارنة بالزمن

الجدول ٣: الفرق بين التراكيز الجرثومية المستخدمة في حقن اجنة البيض

التركيز الجرثومي	منطقة الحقن	كيس المح	الغشاء اللقائقي المشيمي
٤١٠		٠,٧١٩ ± ٦,١٦٢	٠,٧٥٧ ± ٦,٠٢٦٩
٦١٠		* ٠,٦٤٩ ± ٧,٩١٢٧	* ٠,٥٨٧ ± ٧,٦٥٧٤

القيم معبر عنها بمتوسط الجراثيم المعزولة ± الانحراف القياسي.  
\* وجود فرق معنوي عند مستوى معنوية  $P < 0.05$ .

## المناقشة

معظم الانماط المصلية للسالمونيلا ممرضة للانسان والحيوان الا ان الاصابة بالنمط المصلي *Salmonella enterica serovar typhimurium* تسجل اعلى نسبة في مختلف الحيوانات (١٩). تعد جراثيم السالمونيلا من اهم مسببات الامراض في الدواجن ومنتجاتها وخصوصا البيض (٣) وذلك لكونه وسط ملائم لنمو الجراثيم لاحتوائه على جميع المتطلبات الغذائية لنموها وخصوصا في كيس المح (٢٠،٢١).

بينت نتائج الدراسة الحالية موت بعض الاجنة في كل من مجاميع البيض المحقونة في كيس المح والغشاء اللقائقي المشيمي حيث ازدادت نسبة الهلاكات لتصل الى ١٠٠ و ٦٦,٤٪ على التوالي خلال ٧٢-٩٦ ساعة بعد الحقن، اضافة الى موت جميع اجنة مجموعة السيطرة خلال ٢٤ ساعة الاولى من الحقن والذي يعل نتيجة حدوث الصدمة الناتجة عن افراز الذايفان الداخلي لجراثيم *Salmonella enterica serovar typhimurium* (٢٢)، وهذا يدل على فوعة جراثيم *Salmonella enterica serovar typhimurium*.

- membrane of hen's eggs [master's thesis]. British Columbia: University of British Columbia; 1951. 26-30.
19. Hadad JJ. Veterinary microbiology. Mosul: Al-hekma Publishing and Printing; 1991. 368-380 p. DDC:636,089601 242
  20. Al-Aarajy AIG. A study on pathogenesis of *Salmonella enteritidis* isolated from fawbro breeder lines in embryonated egg and newly hatched chicks. MSc thesis, University of Mosul; 2004. (١٠-١١)
  21. Bradshaw JG, Shah DB, Forney E, Madden JM. Growth of *Salmonella enteritidis* in yolk of shell eggs from normal and seropositive hens. J Food Prot. 1990;53(12):1033-6. DOI: 10.4315/0362-028X-53.12.1033
  22. Ramli ZB. The pathology of *Salmonella postsdam* infection in yolk membrane and embrtonated chicken eggs [master's thesis]. Putra: Universiti Putra Malaysia; 2005.54-57. <https://core.ac.uk/download/pdf/32408494.pdf>
  23. Postal UFGC. Infecção experimental de embriões de frango de corte com *Salmonella enterica* serovar Enteritidis fagotipo 4. Arq Bras Med Vet Zootec. 2008;60(5):1110-7. DOI.org/10.1590/S0102-09352008000500011
  24. Gast RK, Guraya R, Guard J, Holt PS. Multiplication of *Salmonella enteritidis* in egg yolks after inoculation outside, on, and inside vitelline membranes and storage at different temperatures. J Food Prot. 2010;73(10):1902-6. DOI: 10.4315/0362-028x-73.10.1902
  25. Gast RK, Holt PS, Murase T. Penetration of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella heidelberg* into egg yolks in an in vitro contamination model. Poult Sci. 2005;84(4):621-5. DOI: 10.1093/ps/84.4.621
  26. Pinto AT, Mendonça AD, Silva EN. Isolated or associated experimental contamination of albumen and egg yolk for *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli*: Influence of temperature and storage time. Arq Bras Med Veterinária e Zootec. 2009;61(1):128-34. DOI:10.1590/S0102-09352009000100018
  27. Takase K, Nakayama T, Kawai T, Fujikawa H. Growth of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* in egg yolks from highly immunized hens. J Vet Med Sci. 1999;61(8):959-60. DOI: 10.1292/jvms.61.959
  28. Gast RK, Holt PS. Assessing the frequency and consequences of *Salmonella enteritidis* deposition on the egg yolk membrane. Poult Sci. 2001;80(7):997-1002. DOI: 10.1093/ps/80.7.997
  29. Moreau MR, Wijetunge DS, Bailey ML, Gongati SR, Goodfield LL, Hewage EM. Growth in egg yolk enhances *SALMONELLA enteritidis* colonization and virulence in a mouse model of human colitis. PLoS One. 2016;11(3):1-15. DOI: 10.1371/journal.pone.0150258
  30. Baron F, Gautier M, Brule G. Factors involved in the inhibition of growth of *Salmonella enteritidis* in liquid egg white. J Food Prot. 1997;60(11):1318-23. DOI: 10.4315/0362-028X-60.11.1318.
  31. McAuley CM, Duffy LL, Subasinghe N, Hogg G, Coventry J, Fegan N. *Salmonella typhimurium* and *Salmonella sofia*: Growth in and persistence on eggs under production and retail conditions. Biomed Res Int. 2015;15:1-8. DOI: 10.1155/2015/914987
  32. Cogan TA, Jorgensen F, Lappin-Scott HM, Benson CE, Woodward MJ, Humphrey TJ. Flagella and curli fimbriae are important for the growth of *Salmonella enterica* serovars in hen eggs. Microbiol. 2004;150(4):1063-71. DOI: 10.1099/mic.0.26791-0
  33. Rocha-e-Silva R, Cardoso W, Teixeira R, Albuquerque A, Horn R, Cavalcanti C. *Salmonella gallinarum* virulence in experimentally-infected Japanese quails (*Coturnix japonica*). Rev Bras Ciência Avícola. 2013;15(1):39-45. DOI:10.1590/S1516-635X2013000100007
  34. Messens W, Grijspeerd K, De Reu K, De Ketelaere B, Mertens K, Obamelis F. Eggshell penetration of various types of hens' eggs by *Salmonella enterica* serovar enteritidis. J Food Prot. 2007;70(3):623- DOI: 10.4315/0362-028x-70.3.6238.
  1. Howard ZR, O'Bryan CA, Crandall PG, Ricke SC. *Salmonella* Enteritidis in shell eggs: current issues and prospects for control. Food Res Int. 2012;45(2):755-64. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.04.030
  2. Whiley H, Ross K. *Salmonella* and eggs: From production to plate. Int J Environ Res Public Health. 2015;12(3):2543-56. DOI: 10.3390/ijerph120302543
  3. Wales AD, Davies RH. A critical review of *Salmonella typhimurium* infection in laying hens. Avian Pathol. 2011;40(5):429-36. DOI: 10.1080/03079457
  4. Xiong D, Song L, Pan Z, Jiao X. Identification and discrimination of *Salmonella enterica* serovar gallinarum biovars pullorum and gallinarum based on a one-step multiplex PCR assay. Front Microbiol. 2018;9(6):1-9. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01718
  5. Hameed U, Akram W, Anjum MS. Effect of *Salmonella* on hatchability and fertility in laying hen, an assessment. Vet J. 2014;2(2):20-3. <http://thesciencepublishers.com/veterinaria/files/2014005.pdf>
  6. Williams JE, Dillard LH, Hall GO. The penetration patterns of *Salmonella typhimurium* through the outer structures of chicken eggs. Avian Dis. 1968;12(3):445-66. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4879637>
  7. Fyrouz A, Hassan ER, Rabiee Nagwa S. Studies on pathogens causing low hatchability in eggs and the effect of *Lactobacillus acidophilus* on controlling of *Salmonella Typhimurium* and *Proteus*. Rep Opin. 2011;3(2):8-13. <https://search.emarefa.net/ar/download/BIM-589030>
  8. Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella enteritidis*: Review article. FEMS Microbiol Rev. 2009;33(4):718-38. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2008.00161.x
  9. Cox NA, Richardson LJ, Buhr RJ, Musgrove MT, Berrang ME, Bright W. Bactericidal effect of several chemicals on hatching eggs inoculated with *Salmonella* serovar typhimurium. J Appl Poult Res. 2007;16:623-7. DOI: 10.3382/japr.2007-00039.
  10. Cason JA, Cox NA, Bailey JS. Transmission of *Salmonella typhimurium* during hatching of broiler chicks. Avian Dis. 1994;38(3):583-8. DOI: 10.2307/1592082
  11. Hamad MA, Al-Aalim AM, Ali HH. Diagnosis of *Salmonella* spp. from internal organs of starlings and quails birds. 2nd scientific conference of faculty of Vet Med UNI Kufa 12-13 feb. 2014;47-51
  12. Sutton S. Determination of inoculum for microbiological testing. J GXP Compliance. 2011;15(3):49-53. DOI: 10.1002/9780470054581
  13. Savi GD, Bortolotto T, Simoes LR, Barichello T. Elimination of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in artificially contaminated eggs through correct cooking and frying procedures. Food Sci Technol. 2011;31(2):492-6. DOI.org/10.1590/S0101-20612011000200033
  14. Cruickshank R, Duguid JP, Marmion B., Swain RH. Medical microbiology. 12th ed. New York: Longman Group Limited; 1975.587 p. <http://www.scirp.org/ReferenceID=573231>
  15. Al-Aalim AM. Isolation and identification of *Salmonella* microorganisms from pigeons and their pathogenicity in broiler chicks. Bas J Vet Res. 2017;16(1):333-47. DOI: 10.23975/bjvet.2017.2701.
  16. Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan P, Fanning S, Fitz ES. Veterinary microbiology and microbial disease. 2nd ed. London: Wiley-Blackwell; 2011. 928 p. [https://www.wiley.com/en- ISBN-9781405158237](https://www.wiley.com/en-ISBN-9781405158237)
  17. Vali AN. Cultivation of Four Strains of the Trachoma Agent in Allantoic Cavity of the Embryonated Chicken Egg. Am J Path. 1968;66(1):110-112. DOI: 10.1016/0002-9394(68)91800-X
  18. Cleveland EMD. The cultivation of bacteria upon the chorioallantoic