

# PREŽIVLJAVANJE BAKTERIJE SALMONELLA ENTERITIDIS U KOKOŠJIM JAJIMA IZ SLOBODNOG UZGOJA

---

**Radojković, Dinko**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:741828>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-30**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Dinko Radojković

**PREŽIVLJAVANJE BAKTERIJE *SALMONELLA* ENTERITIDIS U  
KOKOŠJIM JAJIMA IZ SLOBODNOG UZGOJA**

Diplomski rad

Rijeka, 2021. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Dinko Radojković

**PREŽIVLJAVANJE BAKTERIJE *SALMONELLA* ENTERITIDIS U  
KOKOŠJIM JAJIMA IZ SLOBODNOG UZGOJA**

Diplomski rad

Rijeka, 2021. godina

Mentor rada: Doc.dr.sc. Mateja Ožanič, dipl. sanit. ing.

Završni rad obranjen je dana 14.07.2021. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc. dr. sc. Mateja Ožanič, dipl. sanit. ing.
2. prof. dr. sc. Darinka Vučković, dr. med.
3. izv. prof. dr. sc. Lara Batičić, dipl. sanit. ing.

Rad ima 50 stranica, 11 slika i 81 literaturni navod.

## ZAHVALA

*Veliku zahvalnost, u prvome redu, dugujem svojoj mentorici, doc.dr.sc. Mateji Ožanič, na prenesenome znanju, izrazitome strpljenju i vodstvu pri izradi ovoga završnoga rada. Hvala Vam na izdvojenome vremenu te korisnim savjetima i potpori koji su mi omogućili najbolju realizaciju diplomskoga rada.*

*Zahvaljujem se prof. dr. sc. Darinki Vučković i izv. prof. dr. sc. Ivani Gobin na korisnim savjetima tijekom realizacije ovoga rada.*

*Također, zahvaljujem se svim profesorima i asistentima sa zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju na ugodnome boravku pri izradi eksperimentalnoga dijela diplomskoga rada.*

*Naposljetku, ovim radom izražavam zahvalnost svojim roditeljima koji su mi uvijek bili podrška i oslonac tijekom studiranja.*

*Dinko Radojković*

## SAŽETAK

Jaja su glavni sastojak ljudske prehrane, a na globalnom nivou konzumiraju se u velikim količinama. Predstavljaju "cjelovitu hranu" i potrošači ih prepoznaju kao bogati izvor uravnoteženih esencijalnih hranjivih sastojaka. Tijekom prve polovice 20. stoljeća došlo je do naglog porasta u industriji proizvodnje jaja pri čemu su se pojavile i različite metode uzgoja kokoši nesilica. Danas je sve popularniji slobodni uzgoj, u kojem životinje barem dio dana ili cijeli dan imaju pristup otvorenom prostoru.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati mikrobiološku čistoću i prisutnost bakterija *Salmonella spp.* i *Campylobacter spp.* pri različitim temperaturama čuvanja jaja, kao i ispitati preživljavanje bakterije *S. Enteritidis* na površini jaja te sposobnost njene penetracije u unutrašnji sadržaj jaja pri temperaturi 4 °C i 21°C.

Ispitivanje je provedeno na domaćim jajima iz slobodnog uzgoja standardnim mikrobiološkim metodama selektivnog obogaćivanja i naciepljivanja na selektivne hranjive podloge. Analizom površine ljuske jaja nisu izolirane bakterije *Salmonella spp.* i *Campylobacter spp.* tijekom 14 dana dok je kod jaja inokuliranih suspenzijom *S. Enteritidis* zabilježen značajniji rast pri temperaturi od 21°C kao i penetracija u unutrašnji sadržaj jaja 15., 18. i 21. dan.

Ključne riječi: kokošja jaja, slobodan uzgoj, *S. Enteritidis*

## ABSTRACT

Globally, eggs are the main ingredients of the human diet and are consumed in large quantities. They represent „wholesome foods“ and are recognized by consumers as a rich source of balanced essential nutrients. During the first half of the 20<sup>th</sup> century, there was a sharp increase in the egg production industry, with various methods of laying hens rearing.

The aim of this study was to examine the microbiological purity and presence of *Salmonella spp.* and *Campylobacter spp.* at different egg storage temperatures, as well as to examine the survival of *S. Enteritidis* on the egg's surface and its ability to penetrate the internal egg content at different egg storage temperatures.

The experiments were performed on home-grown free-range eggs using standard microbiological methods of selective enrichment and selective nutrient media inoculation. During the period of 14 days, *Salmonella spp.* and *Campylobacter spp.* were not isolated from the egg's shell. In experiment where the eggs were treated with suspension of *S. Enteritidis*, a significant bacterial growth occurred at 21 °C as well as the penetration of the said bacteria into the egg's internal content during the 15<sup>th</sup>, 18<sup>th</sup> and the 21<sup>st</sup> day.

Key words: chicken eggs, free range, *S. Enteritidis*

<b>1. Uvod</b> .....	<b>1</b>
1.1. Domaća kokoš (lat. <i>Gallus gallus domesticus</i> ).....	2
1.1.1. Opće karakteristike.....	2
1.1.2. Kokoš hrvatica.....	3
1.2. Kokošja jaja.....	4
1.2.1. Stvaranje i struktura jaja.....	4
1.2.2. Građa i sastav jaja.....	7
1.2.2.1. Žumanjak.....	8
1.2.2.2. Bjelanjak.....	9
1.2.2.3. Ljuska jaja.....	11
1.2. Proizvodnja konzumnih jaja.....	12
1.3.1. Kavezni (baterijski) uzgoj.....	13
1.3.2. Podni (stajski) uzgoj.....	13
1.3.3. Slobodni uzgoj.....	13
1.3. <i>Salmonella spp.</i> .....	14
1.3.2. <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	15
1.3.2.1. Epidemiologija.....	16
1.4.1.2. Povezanost jaja i salmoneloze.....	16
1.4. <i>Campylobacter spp.</i> .....	17
1.5.1. Opće karakteristike.....	18
1.4.1. Epidemiologija.....	19
1.5.4. Kampilobakteri u peradi.....	20
<b>2. Cilj istraživanja</b> .....	<b>21</b>
<b>3. Materijali i metode</b> .....	<b>22</b>
3.1. Materijali.....	22



3.1.1. Laboratorijski pribor i oprema .....	22
3.1.3. Uzorci jaja .....	23
3.1.4. Uzorci bakterija .....	23
3.2. Metode.....	23
3.2.1. Priprema hranjivih podloga .....	23
3.2.1.1. Agar s kvašćevim ekstraktom.....	23
3.2.1.2. XLD agar .....	23
3.2.1.2. Karmali agar .....	24
3.2.1.3. BHI bujon .....	24
3.2.1.4. GN bujon (Hajna).....	24
3.2.1. Analiza mikrobiološke čistoće jaja .....	25
3.2.1.1. Metoda određivanja broja ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija .....	25
3.2.1.2. Dokazivanje bakterije Salmonella spp. i Campylobacter spp. ....	25
3.2.2. Preživljavanje <i>S. Enteritidis</i> na površini ljuske jaja .....	27
3.2.3. Statistička obrada podataka.....	28
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>29</b>
4.1. Analiza mikrobiološke čistoće domaćih jaja iz slobodnog uzgoja .....	29
4.2. Preživljavanje <i>S. Enteritidis</i> na površini ljuske jaja .....	32
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>35</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>41</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>42</b>
<b>8. POPIS SLIKA.....</b>	<b>49</b>
<b>9. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>50</b>

## 1. Uvod

Kokoš i čovjek koegzistiraju nekoliko tisućljeća. Čovjek kokoši drži prvenstveno kao izvor hrane, konzumirajući njihovo meso i jaja. Domaća kokoš (lat. *Gallus gallus domesticus*) ima dugu povijest i pokazuje varijacije tijekom svojega postojanja. Njezina upotreba za hranu bila je očita tijekom Rimskoga carstva, koje je zaslužno za razvoj pasmina, a posebice za proizvodnju jaja (1). Danas su kokošja jaja jedna od najzastupljenijih namirnica u svijetu, bez obzira na vjeru i etničku pripadnost, a tijekom posljednjeg desetljeća zabilježen je značajan porast upotrebe jaja u različitim vrstama prehrambenih proizvoda (kolači, sladoled, tjestenina...) (2). Kokošja jaja glavna su komponenta ljudske prehrane koja služi kao prehrambeni izvor proteina, masti i drugih hranjivih sastojaka, a sastoji se od vanjske ljuske, bjelanjka (2/3) i žumanjka (1/3) (3). Bjelanjak je izvrstan prirodni izvor visokokvalitetnih proteina koji obiluju esencijalnim aminokiselinama. Žumanjak je izvor antioksidansa, aromatičnih aminokiselina, karotenoida, vitamina, fosfolipida i proteina koji, ne samo da daju hranjivu vrijednost, već zbog svojega sastava imaju blagotvorno djelovanje na čovjekovo zdravlje (4). Godišnje se uzgaja više od 50 milijardi peradi kao izvor hrane u obliku mesa ili jaja. Kokoši uzgojene za proizvodnju jaja obično se nazivaju kokama nesilicama, dok se pilići uzgajani zbog mesa često nazivaju tovljeni pilići (brojleri). Kokoš nesilica u prosjeku proizvede jedno jaje dnevno, a jaja polažu kada napune 21. tjedan. Stoga je potrebno planiranje da proizvodnja jaja bude stalna kako bi se udovoljilo potražnji na tržištu. U područjima s toplom i vlažnom klimom komercijalne hibridne kokoši nesilice daju u prosjeku između 180 i 200 jaja godišnje, dok u umjerenoj klimi kokoši nesilice u prosjeku proizvode između 250 i 300 jaja godišnje (5). Hrana životinjskoga podrijetla, posebno perad i proizvodi od peradi te sirova jaja, dugi su niz godina poznati kao potencijalni uzročnici pojave salmoneloza kod ljudi. Široko je poznato da su kokoši značajan rezervoar infekcije salmonelom u čovjeka zbog sposobnosti salmonele da se razmnožava u gastrointestinalnom traktu, a potom preživljava na komercijalno prerađenom mesu i jajima (6). Tijekom posljednjih 20 godina *Salmonella* Enteritidis glavni je uzročnik epidemija salmoneloze koja se prenosi hranom kod čovjeka, a kontaminirana kokošja jaja su bila najvažniji nosioci zaraze. Jaja su najčešće kontaminirana salmonelom na vanjskoj ili unutrašnjoj površini ljuske. Unutarnja kontaminacija može biti rezultat prodiranja kroz ljusku jajeta ili izravnim onečišćenjem sadržaja neposredno prije polaganja, koje potječe od infekcije reproduktivnih organa. Kada salmonela uđe u jaje, ona se mora nositi s antimikrobnim učinkom vitelinske ovojnice i proteina bjelanjka prije nego migrira u žumanjak (7). U 2019. godini na

području EU zabilježeno je 87.923 potvrđenih slučajeva salmoneloze s prevalencijom od 20,0 slučajeva na 100.000 stanovnika. Većina (72,4%) epidemija salmoneloze izazvanih hranom uzrokovana je bakterijom *S. Enteritidis*. Najosjetljivija vrsta hrane, u kojima je dokazano izbijanje salmoneloze, bila su jaja i proizvodi od jaja, zatim pekarski proizvodi, svinjsko meso i miješana hrana (8). Uz salmonelu, bakterije iz roda *Campylobacter spp.* vodeći su uzrok bakterijskih bolesti koje se prenose hranom u većini razvijenih zemalja. *Campylobacter jejuni* poznat je kao najčešći uzročnik kampilobakterioza. Većina slučajeva ljudske kampilobakterioze javljaju se sporadično, a prvenstveno je rezultat konzumiranja nedovoljno termički obrađenog mesa peradi i jaja (9). Kokoši nesilice i brojleri obično se smatraju prirodnim domaćinom jer sadrže veliko opterećenje *C. jejuni* u svojem gastrointestinalnom traktu, posebno u slijepim vodovima debelog crijeva. Procjenjuje se da je kampilobakterioza kod ljudi u 80% slučajeva uzrokovana mesom i proizvodima peradi, gdje je *C. jejuni* razvio nekoliko mehanizama preživljavanja i kolonizacije koji su odgovorni za njegovu visoku sposobnost prilagodbe (10).

### 1.1. Domaća kokoš (lat. *Gallus gallus domesticus*)

Kokoš (lat. *Gallus*) je rod ptica iz porodice *Phasianidae*. Potječe iz Azije gdje žive 4 vrste divlje kokoši: divlja kokoš (lat. *Gallus gallus*), zelena kokoš (lat. *Gallus variu*), pjegava kokoš (lat. *Gallus sonneratii*) i cejlonska kokoš (lat. *Gallus lafayetii*). Divlja kokoš malenoga je rasta, a godišnje snese do 20 jaja. Smatra se da je domaća kokoš (lat. *Gallus domesticus*) pripitomljena iz divljeg izvornog oblika *Gallus* u Indiji oko 3000. p.n.e, a oko 600. p.n.e proširila se do Grčke, odakle je prenesena u prve grčke kolonije na jugu Hrvatske. Na područje današnje Hrvatske proširila se u doba rimske vlasti. Uzgojen je veliki broj sojeva koji se međusobno razlikuju građom tijela, uzrastom, bojom perja i brojem položenih jaja. Nakon 1950., napretkom molekularne biologije stvoreni su specijalizirani laki hibridi za proizvodnju jaja i teški hibridi za proizvodnju brojlera (11).

#### 1.1.1. Opće karakteristike

Domaća kokoš visine je manje od 70 cm i u prosjeku teži oko 2,6 kg. Mužjaci (zvani pijetlovi) i ženke (kokoši) poznati su po svojim "mesnatim" krijestama koje mogu biti različita oblika i visokim repovima u obliku srpa. U nekih pijetlova rep se može protezati dulje od 30 cm. Kokoši se uglavnom uzgajaju u proljetnim i ljetnim mjesecima. Polaganje jaja potaknuto je djelovanjem dugog dnevnog svjetla koje se javlja tijekom toplijih mjeseci. Međutim, umjetna

svjetla postavljena u kokošinjcima mogu poticati njihovo polaganje tijekom cijele godine. Vrijeme između ovulacije i polaganja jaja iznosi približno 23-26 sati, dok se naknadne ovulacije mogu dogoditi unutar sat vremena nakon polaganja jaja, što nekim kokošima omogućuje proizvodnju do 300 jaja godišnje. Oplodeni embriji se brzo razvijaju, a pilići se izlegu otprilike nakon 21 dan. Izlegnuti pilići brzo sazrijevaju, a nakon četiri do pet tjedana postaju potpuno prekriveni perjem. Kokoši u najboljim uvjetima mogu živjeti šest do osam godina, dok većina kokoši, koje se koriste u peradarskoj industriji za proizvodnju jaja, prožive dvije do tri godine, nakon čega ih se uglavnom koristi za proizvodnju hrane za životinje (12).



Slika 1. Domaća kokoš

(izvor: vlastita slika)

### 1.1.2. Kokoš hrvatica

Kokoši hrvaticice pripadaju skupini kokoši mješovitih svojstava, što znači da su podjednako dobre za proizvodnju jaja, ali i za proizvodnju mesa. Odrasli pijetlovi prosječno teže oko 2,5 kg, dok su kokoši nešto lakše (13). Kokoši hrvaticice po fenotipu pripadaju skupini mediteranskih pasmina. Vanjske odlike pasmine su neoperjano lice crvene boje, malena glava bez kukmice i jednostruka krijesta s uzdignutom zastavicom. Tijelo im je trokutasta oblika, a leđa su im prilično široka. Pijetlov rep uzdignut je pod pravim kutom, dok u kokoši ima oblik trokuta. Ovisno o boji perja, kokoš hrvatica se može podijeliti na 4 soja, a to su: crni, crveni, jarebičasto-zlatni i crno-zlatni soj, od kojih je, prema izvještaju Hrvatske poljoprivredne agencije iz 2018. najčešći crveni

soj (14). Za sve 4 vrste bijeli podušnjaci su karakteristika po kojoj su kokoši hrvatice prepoznatljive, a kod crvenoga i jarebičasto-zlatnog soja bijele noge, dok su kod crnog i zlatnoga soja noge sivkaste boje (13).

## 1.2. Kokošja jaja

Jaja mnogih vrsta ptica nesumnjivo su bila konzumirana od samog početka čovječanstva (15). Glavni su sastojak ljudske prehrane, a na globalnoj razini konzumiraju se u velikim količinama. Oni predstavljaju "cjelovitu hranu" i potrošači ih prepoznaju kao bogati izvor uravnoteženih esencijalnih hranjivih sastojaka. Uz to, jaja su preventivne prirode, a imaju terapijski potencijal. Jeftin su i niskokaloričan izvor visokokvalitetnih proteina i drugih hranjivih sastojaka koji su korisni za čovjekovo zdravlje. Kvaliteta jaja definira one karakteristike jaja koje utječu na prihvatljivost i preferencije potrošača. Nakon što su jaja položena njihova se kvaliteta ne može poboljšati, stoga je njihovo čuvanje uglavnom preventivni postupak koji je presudan za održavanje početne kvalitete. Kvaliteta jaja pod utjecajem je nekoliko čimbenika, uključujući uzgoj, temperaturu, vlažnost, rukovanje, skladištenje i dob jajeta. Unutrašnja kvaliteta najvažnija je za potrošače, a počinje opadati neposredno nakon polaganja jaja. Određuju je nekoliko komponenata: kvaliteta žumanjka i bjelanjka, kvaliteta ljuske i ukupna kvaliteta. Brzo skupljanje i hlađenje jaja te skladištenje u hladnjaku na odgovarajućoj temperaturi i vlažnosti smanjuje njihovu degradaciju (16).

Peradarska industrija jedna je od svjetskih najbrže rastućih stočarskih industrija. Proizvodnja i potrošnja jaja udvostručile su rast posljednjih nekoliko desetljeća gdje je njihova proizvodnja dosegla 68,26 milijuna tona u 2013. godini, uz porast od 94,6% u odnosu na 35,07 milijuna tona 1990. godine (17).

### 1.2.1. Stvaranje i struktura jaja

Ptice su oviparne životinje i proizvode kleidoničko jaje koje je gotovo potpuno izolirano od vanjske sredine. Jaja sadrže sve bitne hranjive sastojke za razvoj embrija u vanjskom okruženju. Posjeduje fizičku zaštitu (ljusku), ali i složeni sustav kemijske obrane koji osigurava opstanak embrija u nepovoljnim vanjskim uvjetima. Jaje je najveća stanica u životinjskom carstvu koja proizlazi iz jedne stanične diobe. Raznolikost komponenata jaja i njihova idealna ravnoteža zaslužni su za hranjiva svojstva kokošnjih jaja (18).

Stvaranje jaja je proces koji se događa za otprilike 25-26 h od ovulacije do nastanka zrelog jajeta. Započinje s dozrijevanjem jajne stanice (koja je običan žumanjak i zametni disk) u reproduktivnom traktu, što rezultira nastankom jajeta s tvrdom ljuskom sa zaštitnim membranama i potrebnim hranjivim tvarima za razvoj embrija. Glavne faze u stvaranju jaja uključuju stadij ovulacije, stadij oplodnje, formiranje i nastanak zrelog jajeta. Sve ove faze odvijaju se u jajniku i jajovodu. Sami se proces može jasnije razumjeti na slici 2.

U jajniku se jajna stanica (oocita) oslobađa iz folikula postupkom poznatim kao ovulacija. Ona se odvija otprilike 5 do 10 minuta nakon polaganja prethodnog jajeta. Ovoj je fazi prethodila proizvodnja žumanjka koja omogućuje embriju odgovarajuće hranjive sastojke ključne za razvoj. Prehrana bogata kalcijem u ovoj je fazi prijeko potrebna jer će kasnije imati primjenu tijekom stvaranja ljuske. Hranjive tvari apsorbirane iz probavnog trakta kokoši u krvotoku se pretvaraju u žumanjak putem kokošje jetre, a zatim se žumanjak transportira iz jetre u jajnik krvotokom. Folikularne stanice oko jajne stanice uzimaju žumanjak te druge hranjive sastojke i prenose ih u jajnu stanicu. Nezrele jajne stanice i njihove susjedne folikularne stanice ugrađuju se u jajnik. Jajna stanica se vremenom povećava nakupljanjem žumanjka do svojega maksimalnog volumena, pri čemu započinje postupno kontinuirano potiskivanje ugniježdene jajne stanice i folikula prema vanjskome rubu jajnika.

Kada se u jajnoj stanici nakupi dovoljna količina žumanjka za razvoj embrija, jajna stanica pukne iz folikula postupkom ovulacije. Slobodna jajna stanica (*ovum*) pada u „džep“ jajnika i za nekoliko minuta zahvaća infundibulum i uvodi se u lijevi jajovod kokoši. Prije nego što jajnu stanicu zahvati infundibulum, jezgra jajne stanice prolazi kroz proces primarnih dioba stanica (mejoza), na kraju dajući zrelu jajnu stanicu koja ulazi u infundibulum. Do oplodnje dolazi unutar infundibuluma ako je spermij dostupan, a rezultirajuća zigota time započinje sekundarnu diobu stanica mitozom. U ovoj fazi dolazi i do nakupljanja prvih slojeva bjelančevina, a preostali proces stvaranja jajašaca dovršava se tijekom putovanja niz jajovod. Jajovod je podijeljen u šest različitih dijelova: infundibulum, magnum, prevlaka, žlijezda za proizvodnju ljuske (maternica), rodnica i kloaka (nečisnica) (19).

Infundibulum je mišićava ljevčasta struktura koja označava početak jajovoda. U neposrednoj je blizini rastućih folikula i okružuje ih, tako da je ovulirani folikul zarobljen i usmjeren prema silaznim dijelovima jajovoda. Infundibulum nema sekretorne funkcije i jaje ostaje

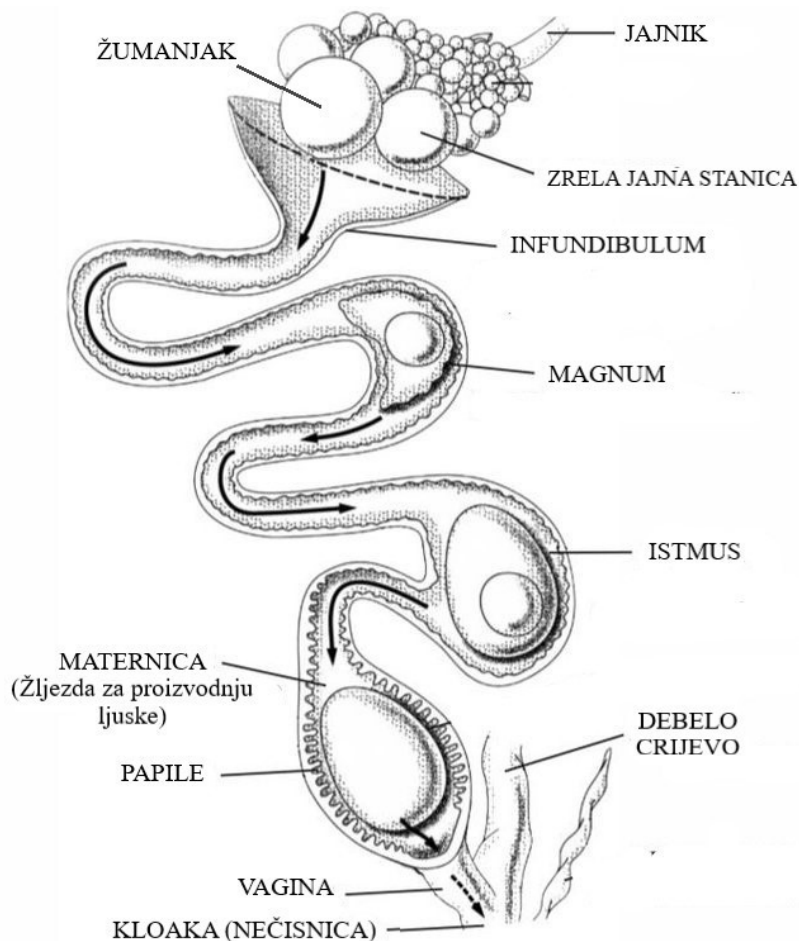
ovdje tijekom 15 do 17 minuta. Međutim, ako infundibulum ne radi pravilno, folikul može ovulirati izvan jajovoda u unutarnju peritonealnu šupljinu (20).

Magnum je najduži dio jajovoda koji doprinosi stvaranju proteina i formiranju bjelanjka tijekom 3 sata prolaska kroz ovaj segment. Sinteza albumina uglavnom se kontinuirano događa u stanicama cjevastih žlijezda magnuma. Međutim, brzina taloženja se povećava kada je jaje prisutno u ovom dijelu jajovoda. Proteini koji su najčešće prisutni u bjelanjku su ovoalbumin, ovomucin i konalbumin. Albumin pruža antimikrobnu funkciju prije inkubacije jajeta, a njegovi su proteini glavni izvor prehrane rastućeg embrija tijekom inkubacije.

Istmus je prevlaka koja premošćuje magnum i žlijezdu za proizvodnju ljuske (maternicu) u jajovodu kokoši. Kada nerazvijeno jaje prolazi kroz istmus, izlučuje se membrana ljuske koja se ovija oko bjelanjka. Membrana ljuske jajeta građena je od vlaknastih proteina (poput kolagena) te pruža strukturnu osnovu za kalcifikaciju ljuske jajeta. (21).

Maternica (lat. *uterus*) kokoši poznata je pod nazivom žlijezda ljuske, a sekreti žlijezda djeluju na vanjski kalcificirani zaštitni sloj. Jaje tijekom svog formiranja najduže ostaje u maternici. Formiranje traje 20 sati, tijekom kojih se događa kalcifikacija ljuske jajeta u tri faze: inicijacija, rast i završetak. Tijekom faze inicijacije brzina kalcifikacije je spora, naglašena je tijekom 15 sati, a u posljednja dva sata prije polaganja je najsporija. Pigmenti (protoporfirin i biliverdin) se sintetiziraju u maternici i talože ih cilijarne stanice tijekom posljednja tri sata prije polaganja jajeta (22). Osim što pruža fizičku zaštitu embriju, ljuska jajeta i proteini bjelanjka djelotvorno djeluju i pružaju fizičku i kemijsku zaštitu od bakterijskoga djelovanja (23).

Vagina je kaudalni dio jajovoda piletine i ne igra ulogu u stvaranju jajašaca. Međutim, tu nastaje vanjska kožica i dolazi do pigmentacije jajeta. Mišići rodnice pomažu uzdužno okretanje jajašaca do tupoga kraja i potiskivanje jajašaca iz jajovoda (19).



Slika 2. Prikaz nastanka kokošnjega jajeta

(izvor: [https://www.researchgate.net/publication/326330407\\_Regulation\\_of\\_egg\\_formation\\_in\\_the\\_oviduct\\_of\\_laying\\_hen](https://www.researchgate.net/publication/326330407_Regulation_of_egg_formation_in_the_oviduct_of_laying_hen))

### 1.2.2. Građa i sastav jaja

Jaja su sastavljena od tri glavna dijela: ljuska jajeta s membranom, bjelanjak i žumanjak (24). Od ukupne mase jajeta, 60% otpada na bjelančevine, 30% na žumanjak i 10% na ljusku. Komponente unutar jajeta organizirane su membranama. Dvije usko prijanjajuće unutarnje i vanjske membrane ljuske sastoje se od mreže proteinskih polisaharidnih vlakana. Membrane djeluju kao barijera od bakterijskog djelovanja, razdvajaju bjelančevine i ljusku, pružaju temelj za stvaranje ljuske u jajovodu i čine „džep“ zraka (zračna komora). Zračna komora nastaje na tupom kraju jajeta prilikom njegovog hlađenja i skupljanja. U početku je promjera 5 mm, ali se povećava prilikom skladištenja i koristan je pokazatelj za procjenu starosti jaja. Žumanjak se u središtu jajeta



drži neprozirnim uvijenim bjelančevinastim „konopcima“ (helaza) koji se, na tupom kraju jajeta, uvijaju u smjeru kazaljke na satu (25).

#### 1.2.2.1. Žumanjak

U središtu žumanjka nalazi se latebra - masa bjelanjka u obliku cjevčice koja se proteže sredinom cijelog žumanjka. Sadržaj žumanjka taloži se u koncentričnim prstenovima koji se, ovisno o rasporedu hranjenja i pigmentima topivim u mastima prisutnih u hrani kokoši, razlikuju po boji. Prstenovi se uobičajeno razlikuju u svijetlim i tamno narančasto-žutim slojevima. Tijekom taloženja sadržaja žumanjka, latebra zadržava zametni disk (blastodisk) na površini žumanjka. Zametni disk u početku sadrži ženske kromosome i odgovara mjestu razmnožavanja embrionalnih stanica kada je jajna stanica oplodena u infundibulumu. Žumanjak je zatvoren polupropusnom membranom (vitelinska ovojnica) debljine oko 0,025 mm, a funkcija joj je ograničiti razmjenu materijala između bjelanjka i žumanjka, a ujedno služi i kao krajnja barijera prodiranja bakterija (18, 26).

Primarna uloga žumanjka je pružiti hranjive sastojke za rast i razvoj embrija tijekom inkubacije, budući da 90% hranjivih sastojaka za razvoj embrija dolazi od proteina žumanjka (27). Proteini žumanjka dominantan su izvor esencijalnih aminokiselina za embrij i pružaju mnoge hranjive tvari, uključujući fosfolipide, kolesterol i fosfate (28). Žumanjak je složeni sustav koji sadrži brojne netopive suspendirane čestice, veličine približno 0,3–2 mm u bistro-žutoj viskoznoj tekućini (29). Sadržaj bjelančevina u žumanjku iznosi oko 16%, a sadržaj lipida varira od 32-35%, ovisno o soju kokoši. Frakcija lipida žumanjka sastoji se od 66% triglicerida, 28% fosfolipida, 5% kolesterola i male količine drugih lipida. Glavna komponenta fosfolipida je fosfatidilkolin (73%), a ostali spojevi prisutni su u sljedećim količinama: fosfatidiletanolamin, 15%, lizofosfatidilkolin 6%, sfingomijelin 2,5%, lizofosfatidiletanolamin 2% i plazmalogen 1%. Lipoproteini su klasificirani kao lipoproteini visoke gustoće (HDL), lipoproteini niske gustoće (LDL) i lipoproteini vrlo niske gustoće (VLDL). Gustoća se određuje postotkom lipidnoga materijala u molekuli. HDL frakcija žumanjka sastoji se od fosvitina i  $\alpha$ -,  $\beta$ - te  $\gamma$ -livetina koji sadrže manje od 10% lipida. LDL spojevi su  $\alpha$ - i  $\beta$ -lipovitelin i sadrže oko 20% lipida, dok VLDL lipovitelin sadrži oko 40% lipida. Jedno prosječno jaje sadrži 200-220 mg kolesterola koji se nalazi samo u žumanjku, a njegov sadržaj po gramu žumanjka relativno je konstantne vrijednosti za jaja svih vrsta kokoši. Iz toga razloga, povećanjem veličine žumanjka povećava se i količina kolesterola (26).

Karotenoidi su prirodni pigmenti žumanjaka kokošnjih jaja. Oni mu daju žutu boju koja može prijeći od blijedo žute do tamno narančaste. Karotenoida u jajima nema mnogo, ali posjeduju ekonomski važnost jer predstavljaju kriterij kvalitete. Uglavnom su to karoten i ksantofili (lutein, kriptoksantin i zeaksantin), pri čemu je ukupna koncentracija luteina i zeaksantina deset puta veća od koncentracije kriptoksantina i karotena zajedno. Karoten je najznačajniji karotenoid koji se pronalazi primarno u vrstama kokoši kod kojih je u prehrani najzastupljeniji kukuruz i lucerna. Nakon ulaska u probavni sustav kokoši karoten se u velikoj mjeri oksidira kako bi nastali ksantofili (30).

#### 1.2.2.2. Bjelanjak

Bjelanjak se sastoji od vanjskoga sloja (tzv. rijetkog bjelanjka) (21%), gustoga sloja bjelanjka (55%) i unutarnjega sloja bjelanjka (oko 21%). Neposredno oko žumanjka nalazi se tanki sloj vrlo gustoga sloja bjelanjka koji sadrži helaze (uvijene trake bjelanjka koje idu prema šiljastom i tupom kraju jaja) koje povezuju žumanjak s gustim bjelanjkom i drže ga u sredini jajeta (31). Udjeli rijetkoga i gustoga bjelanjaka ovise o mnogim čimbenicima kao što su težina i brzina polaganja jaja, soj, starost i zdravstveno stanje kokoši, a posebno trajanje i način čuvanja jaja. Bjelanjak čini približno 67% ukupne mase jajeta, a uglavnom se sastoji od vode (87,8%) i proteina (9,7–10,6%), dok ostatak čine ugljikohidrati, pepeo i lipidi u tragovima (1%). Proteini bjelanjaka sastoje se od ovalbumina (koji predstavlja više od 50% ukupnih proteina), ovotransferina, ovomukoida, ovomucina i lizozima. Više od 50% ugljikohidrata nalazi se u obliku slobodne glukoze, dok su ostali šećeri ugrađeni u polisaharidne dijelove glikoproteina bjelanjka. Glavni minerali bjelanjka su kloridi, natrij, sumpor i kalij. Kloridi, natrij i kalij se uglavnom nalaze slobodni u suspenziji bjelanjka, dok je sumpor u pravilu sastavni element bjelančevina bjelanjaka. Kalcij i magnezij prisutni su u jednakim količinama, djelomično su vezani za proteine i heterogeno su raspoređeni između gustoga i tankog bjelanjka. Željezo je prisutno u malim količinama, ali uzimajući u obzir koncentraciju ovotransferina u bjelanjku (oko 1,7 mmol/l) te njegovu sposobnost keliranja dva atoma željeza po molekuli, može se smatrati da se svo željezo prisutno u bjelanjku veže za ovotransferin. Zbog svoje vodene prirode, bjelanjak je uglavnom siromašan vitaminima topljivih u mastima (vitamini A, D, E i K), međutim, sadrži sve vitamine B skupine (32,33).

Bjelanjak je dopuna fizičkoj zaštiti koju osigurava ljuska jaja. To je viskozna biološka tekućina koja se uglavnom sastoji od brojnih bjelančevina koje imaju antibakterijski potencijal, pri

čemu osiguravaju zaštitu jaja od negativnoga bakterijskoga utjecaja. Temperatura je presudna u kontroli rasta bakterija u jajima, ali pH i viskoznost bjelanjka također imaju značajnu ulogu u regulaciji difuzije, rasta i preživljavanja bakterija (bilo izravnim djelovanjem na mikroorganizme ili moduliranjem aktivnosti antimikrobnih bjelančevina). Te se fizičke karakteristike mijenjaju tijekom skladištenja jaja. Prilikom polaganja jajeta, pH vrijednost bjelanjka bliska je neutralnosti i postaje lužnat nakon nekoliko dana skladištenja na sobnoj temperaturi, dosežući pH vrijednost od 9,5. Alkalnost može izravno inhibirati rast bakterija i sintezu flagela. Viskoznost gustog dijela bjelanjka inhibira pokretljivost stanica i ograničava migraciju bakterija prema žumanjku (34).

Ovalbumin je glavna proteinska komponenta bjelanjka koja predstavlja polovinu ukupnih bjelančevina. Starenjem jaja i njihovom termičkom obradom (poput pasterizacije bjelanjka) nativni ovalbumin pretvara se u deaminirani, stabilniji oblik - S-ovalbumin (35). Ovoalbumin je poznat po raznim biološkim aktivnostima (poput antikancerogenih, antihipertenzivnih, antimikrobnih te antioksidativnih aktivnosti), a utvrđena je i visoka antimutagena aktivnost kada je denaturiran toplinom. Antimikrobno djelovanje pokazali su peptidi ovalbumina koji su nastali probavom i bili su aktivni protiv različitih sojeva bakterija, kao i gljiva. Svojstva hidrofobnosti i pozitivnoga naboja ovih peptida važni su za njihovo baktericidno djelovanje (36).

Ovotransferin čini oko 12–13% ukupnih bjelančevina bjelanjka, a tijekom nastanka jajeta sintetizira se u jajovodu. Građen je od monomernoga glikoproteina koji se sastoji od 686 aminokiselinskih ostataka. Kao član obitelji transferina, ovotransferin se savija u dva globularna režnja, od kojih svaki sadrži mjesto vezanja željeza. Osim što pruža antimikrobnu aktivnost, također djeluje i na transport željeza do embrija tijekom razvoja. Smatra se da je antimikrobno svojstvo ovotransferina uvjetovano njegovom sposobnosti da snažno veže željezo čineći ga nedostupnim mikroorganizmima za njihov rast. Do sada je zabilježen široki spektar antifungalnih te antivirusnih, aktivnosti za ovotransferin i njegove izvedene peptide. Antimikrobna svojstva ovotransferina omogućuju njegovu široku primjenu, ponajviše u prehrambenoj industriji u obliku dodanog aditiva (37).

Lizozim je jednolančani polipeptid koji sadrži 129 aminokiselinskih ostataka i čini oko 3,5% ukupnih bjelančevina jajeta. Trodimenzionalna struktura je stabilizirana pomoću četiri disulfidna mosta koji doprinose njegovoj izuzetnoj termostabilnosti. Lizozim posjeduje antifungalna, antivirusna i antibakterijska svojstva (posebice protiv gram-pozitivnih bakterija)

(38). Antibakterijska svojstva odlikuje njegovu sposobnost da hidrolizira  $\beta$ -1,4-glikozidnu vezu između N-acetilmuraminske kiseline i N-acetilglukozamin peptidoglikana, koje su strukturne komponente staničnih stijenki bakterija. Učinkovit je uglavnom protiv gram-pozitivnih bakterija, ali njegov se spektar može proširiti prema gram-negativnim bakterijama denaturacijom, kemijskim modifikacijama ili kombiniranjem s drugim konzervansima (39). Lizozim čini oko 3,5% bjelančevina jaja, a danas se široko koristi u farmaceutskoj industriji kao sastojak lijekova i u prehrambenoj industriji za očuvanje hrane te kao konzervans. Koncentracija i enzimska aktivnost lizozima ovise o mnogim čimbenicima, kao što su prehrana i sustav držanja kokoši te starosti i uvjeti čuvanja jajeta (38).

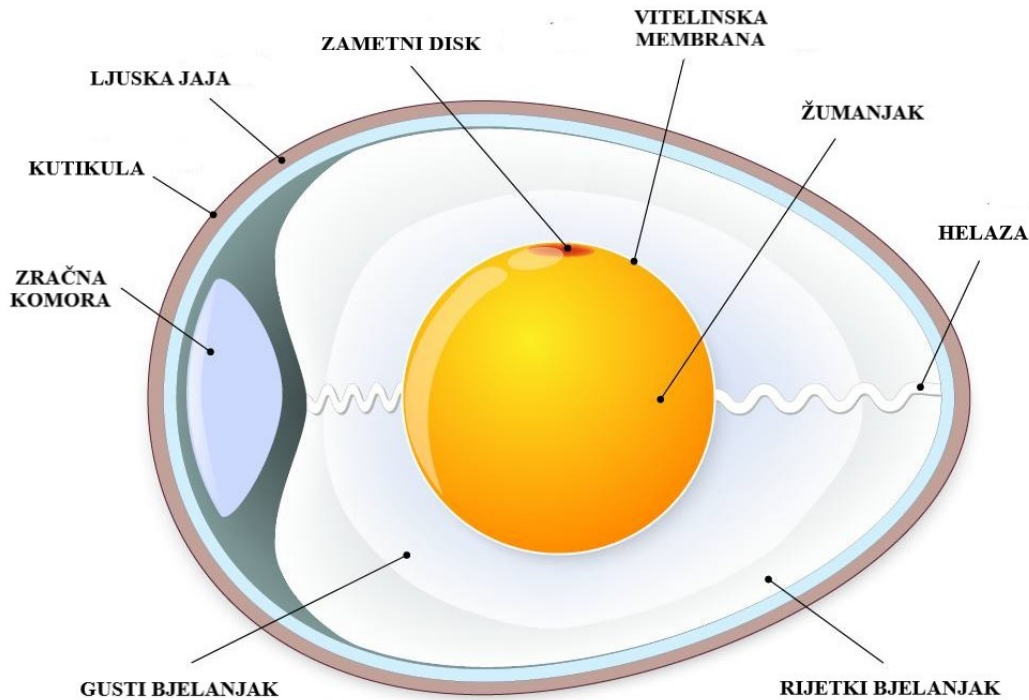
### 1.2.2.3. Ljuska jaja

Membrana ljuske jedna je od primarnih prepreka bakterijskoj invaziji sadržaja jaja. Ona se sastoji od dva sloja: unutarnje i vanjske membrane. Debljina dva sloja membrane varira među različitim pasminama kokoši, ali je u pravilu manja od 0,02 mm. Sastavljene su od proteinskih vlakana koja su raspoređena tako da tvore polupropusnu opnu koja omogućuje izmjenu vlage i plinova.

Ljuska jajeta bitna je za uzgoj i razvoj embrija te ima tri glavne funkcije: zaštita jajeta od vanjskih utjecaja, kontroliranje protoka plinova i vodene pare te osiguravanje dovoljne količine kalcija za razvoj embrija nakon potrošenih zaliha iz žumanjka. Ljuska jajeta porozna je polupropusna struktura koja se sastoji od mreže proteina s ugrađenim mineralnim tvarima (Ca i Mg karbonati i fosfati). Vanjska je površina presvučena vrlo tankim slojem organske tvari mucina – tj. kutikulom. Ispod kutikule nalazi se spužvasti sloj koji je vrlo kompaktan i čini najveći dio ljuske. Unutarnji dio ljuske (mamilarni sloj) sastoji se od brojnih grubih nakupina u obliku konusa (mammillae), čvrsto zbijenih i vrhovima okrenutih prema unutrašnjosti jajeta. Ljuska je prekrivena vrlo malim okruglim otvorima (porama), od kojih su najveći vidljivi golim okom. Na njih se nastavljaju pore kanalića koje idu okomito na površinu i prolaze kroz cijelu debljinu ljuske. Najveći broj pora po jedinici površine ljuske nalazi se na tupome kraju jajašca, a najmanji na šiljastome kraju.

Sastav ljuske relativno je konstantan, ali debljina ljuske može se promijeniti smanjenjem sadržaja kalcija ili nedostatkom vitamina D u prehrani kokoši. Sastav ljuske u pravilu se ne mijenja, ali postotak ljuske u odnosu na cijelo jaje može varirati od 8% do preko 12%. Ljuske jaja variraju

u boji, uglavnom zbog potrebe za kamuflažom u okolišu (ovisno o staništu kokoši). Ljuska jaja domaćih kokoši uglavnom su bijele do smeđe boje, dok neki genotipovi polažu jaja plave i zelene boje(15, 25).



Slika 3. Anatomska građa kokošjeg jajeta

(izvor: <https://www.chickens.allotment-garden.org/eggs/structure-egg/>)

## 1.2. Proizvodnja konzumnih jaja

Tijekom prve polovice 20. stoljeća, sa sve većom potražnjom za jeftinijom hranom došlo je i do općenitoga napretka u stočarstvu, što je bilo popraćeno masovnim širenjem proizvodnih operacija i procesa. U sustavima za proizvodnju kokošjih jaja napravljena su velika dostignuća u uzgoju, što je rezultiralo ogromnim povećanjem produktivnosti. Međutim, tradicionalni načini držanja kokoši u slobodnom i stajskom uzgoju nisu se mogli povećati iz dva razloga: zbog velike potrebe za radnom snagom te higijene i prijenosa bolesti u takvim sustavima proizvodnje. Tijekom prve polovice 20. stoljeća određeni unutarnji paraziti (poput kokcidija i bakterijskih infekcija poput tuberkuloze) bili su pošasti peradarske industrije. Tijekom četrdesetih godina pojavio se uzgojni sustav koji je riješio navedene probleme. Kokoši su bile smještene u kaveze gdje se vršilo

kontrolirano hranjenje i sakupljanje jaja te uklanjanje stajskoga gnoja. U konačnici se takvim sustavima lako upravljalo i sustav se u potpunosti mogao automatizirati. Budući da su kokoši bile zaštićene od svoga izmeta, ciklus ponovne infekcije mogao se prekinuti za mnoge bolesti. Naravno, prelazak na kavezni uzgoj u svojim počecima zahtijevao je velika kapitalna ulaganja.

### 1.3.1. Kavezni (baterijski) uzgoj

Uzgoj jaja u kavezima započeo je prije otprilike 50 godina kao odgovor na brzorastuću potražnju za jajima i potrebu za smanjenjem neprihvatljivo visokih stopa bolesti i smrtnosti kokoši u slobodnome uzgoju. Glavne prednosti kaveznog uzgoja kokoši nesilica u odnosu na alternativne uzgojne sustave su: povećana higijena koja rezultira mnogo nižom učestalošću pojavnosti bolesti koja se širi kokošnjim izmetom, mala brojnost kokoši u kavezu što rezultira smanjenom učestalošću parenja, lakoća upravljanja, bolji uvjeti rada zaposlenih i mnogo niži troškovi proizvodnje. Danas je kavezni uzgoj kokoši često tema društava za zaštitu životinja koje kritiziraju takav uzgoj, ali i druge sustave intenzivne proizvodnje životinja. Glavna mana kaveznog uzgoja je nedostatak fizičkog prostora za kokoši koji im onemogućuje zauzimanje određenog položaja ili izvođenje određenog ponašanja.

### 1.3.2. Podni (stajski) uzgoj

Podni sustav proizvodnje predstavlja jedan od alternativnih načina proizvodnje jaja, a trenutno je najmanje zastupljeni sustav uzgoja u svijetu. Ovakva vrsta proizvodnje odvija se u kontroliranim uvjetima objekta koji najviše slični kaveznome uzgoju kokoši. Trenutno je u Republici Hrvatskoj proizvodnja jaja u stajskome sustavu u porastu, a ukupno se u ovakvom načinu držanja nalazi 88.816 životinja. Prednosti ovakvog sustava je mogućnost smještaja većeg broja životinja po m<sup>2</sup> u kontroliranim uvjetima proizvodnje za razliku od slobodnog uzgoja. Istodobno, ovakav sustav proizvodnje kod potrošača ne stvara percepciju ugroženosti kokoši nesilica kao kod kaveznog uzgoja (41).

### 1.3.3. Slobodni uzgoj

Izraz slobodni uzgoj podrazumijeva da kokoši nesilice, koje se koriste za proizvodnju jaja, imaju pristup otvorenom prostoru, tj. bivanju na otvorenome prostoru tijekom svojega životnoga razdoblja. Kokoši su uglavnom smještene na otvorenom prostoru na kojem se nalaze pokretne kućice ili fiksirane nastambe unutar kojih se nalaze hranilice, pojilice te povišene postavljene

konstrukcije koje kokoši koriste za spavanje i prilikom nevremena. Noću se nastambe zatvaraju zbog zaštite od grabežljivaca, a rano ujutro se kokoši puštaju iz nastambi na otvoreni prostor. S obzirom na to da su domaće kokoši pripitomljene životinje u pravilu se zadržavaju u blizini svojih nastambi, a nerijetko su naučene na polaganje jaja unutar njih. Korištenje pašnjaka i izlaganje sunčevoj svjetlosti dva su ključna razloga zbog kojih jaja iz slobodnog uzgoja mogu imati poboljšana hranjiva svojstva. Istraživanja su pokazala da jaja iz slobodnog uzgoja imaju niže razine triglicerida i povećani sadržaj karotenoida i alfa tokoferola (vitamin E) u žumanjku za razliku od ostalih sustava proizvodnje konzumnih jaja. S obzirom na sve prednosti, pojedine studije su izvijestile kako jaja iz slobodnoga uzgoja imaju veću bakterijsku kontaminaciju, a dokazana je i prisutnost teških metala poput olova (42).

### 1.3. *Salmonella spp.*

Salmoneloza je zarazna bolest uzrokovana bakterijom iz grupe *Salmonella spp.*, a smatra se jednim od najznačajnijih uzročnika bakterijskih zoonoza u čovjeka, životinja i peradi. Salmonela je gram-negativna štapičasta bakterija koja pripada porodici *Enterobacteriaceae*, a čini rod od više od 2300 serotipova koji su visoko prilagođeni za rast kod ljudi i životinja te uzrokuju široki spektar bolesti. Rod se sastoji od dvije velike vrste: *S. enterica* (koja je podijeljena u šest podvrsta) i *S. bongori* (43). Podvrsta *S. enterica* uglavnom je izolirana iz toplokrvnih životinja i čini više od 99% kliničkih slučajeva, dok su preostale podvrste i *S. bongori* uglavnom izolirane od hladnokrvnih životinja i čine manje od 1% slučajeva (44).

Rast *S. Typhi* i *S. Paratyphi* ograničen je samo na čovjeka uzrokujući trbušni tifus, odnosno paratifusnu groznicu, dok je salmoneloza sveobuhvatan pojam koji uključuje invazivnu infekciju svim serotipovima. Netifusnu salmonelozu uzrokuje nekoliko drugih serotipova salmonele, poput *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*, koji se mogu prenijeti na čovjeka. Životinjski proizvodi poput mesa peradi, jaja i mlijeka smatraju se najvažnijim rezervoarima za izbijanje humane salmoneloze (45). Gastroenteritis je najčešća manifestacija infekcije salmonelom u svijetu, praćena bakterijemijom i enteričkom groznicom. Infekcija salmonelom i dalje predstavlja javnozdravstveni problem u cijelome svijetu, doprinoseći ekonomskom opterećenju razvijenih i nerazvijenih zemalja kroz troškove povezane s nadzorom, prevencijom i liječenjem bolesti (46).

### 1.3.2. *Salmonella* Enteritidis

*Salmonella enterica* jedan je od glavnih uzročnika bakterijskih infekcija u cijelome svijetu koja se prenosi hranom. U mnogim je zemljama pojava humane salmoneloze uglavnom posljedica konzumacije jaja, a slijedi meso peradi, svinjetina, govedina i mliječni proizvodi. *Salmonella Enteritidis* prvi puta je opisana kao uzročnik kod peradi sredinom 1970-ih, ali je kasnije postala značajni ljudski patogen. *S. Enteritidis* glavni je uzročnik bolesti koje se prenose hranom i najčešće je otkriveni serotip u epidemijama humane salmoneloze. Povećana potrošnja brze hrane životinjskoga podrijetla i rasta međunarodne trgovine hranom također su imali važnu ulogu u njezinome širenju. *S. Enteritidis* može se širiti okolišem putem fekalne kontaminacije ljudi i životinja. Infektivna doza izrazito je mala, stoga je neophodno da se hrana životinjskoga podrijetla prije stavljanja u promet testira na prisutnost salmonele u svrhu sprječavanja nastanka epidemija humane salmoneloze. Simptomi kod ljudi uključuju mučninu, bolove u trbuhu, blagu groznicu te proljev popraćen teškom dehidracijom organizma. Prvo izvješće o trovanju hranom povezanim sa salmonelom dogodilo se u Njemačkoj 1888. godine u kojem je 50 osoba, koje su konzumirale sirovo mljeveno meso, oboljelo, a jedno čak i umrlo (47).

*Salmonella enterica* fakultativna je gram-negativna štapičasta bakterija veličine 2-5  $\mu\text{m}$  koja pripada porodici *Enterobacteriaceae*. Pripadnici ovoga roda imaju sposobnost metaboliziranja hranjivih tvari oksidacijskim i fermentacijskim putovima te se nazivaju kemoorganotrofi. *S. Enteritidis* proizvodi sumporovodik, fermentira glukozu, ali ne fermentira laktozu. Ovo važno jedinstveno svojstvo korišteno je za razvoj različitih selektivnih i diferencijalnih medija za kulturu, izolaciju i identifikaciju salmonele. Mediji koji se koriste za dokazivanje salmonele su: *Salmonella*/*Shigella* agar (SS), briljantno-zeleni agar (BGA), ksiloza-lizin-deoksikolatni (XLD) agar, MacConkey agar, lizin željezo (LIA) i trostruki šećer željezo (TSI) agar. Izolacija salmonele iz briseva, hrane i drugih uzoraka okoliša koristi tradicionalne ili konvencionalne metode uzgoja, uključujući više koraka prethodnog obogaćivanja i rasta na selektivnim i diferencijalnim podlogama u svrhu povećanja osjetljivosti otkrivanja. Dokazivanje uključuje početno neselektivno obogaćivanje definiranoga volumena uzorka, nakon čega slijedi korak selektivnog obogaćivanja, nanošenje na selektivne agare, a zatim biokemijska i serološka potvrda sumnjivih kolonija. Kolonije salmonele na XLD agaru pojavljuju se kao bezbojne kolonije s crnim središtima, a na BGA agaru u obliku ružičasto-bijelih ili crvenih kolonije okruženih crvenom halo zonom.



Salmonela ima sposobnost rasta i razmnožavanja izvan živih organizama u različitim uvjetima okoliša. Većina serotipova uspijeva i raste na temperaturnom području 5-47 °C uz optimum 32-35 °C. Međutim, nekoliko serotipova može rasti na mnogo širim temperaturama 2-4 °C ili čak 54 °C. Salmonela je osjetljiva na toplinu i često je ubijena na temperaturama iznad 70 °C. pH potreban za rast salmonele kreće se 4-9, s optimalnim rasponom između 6,5 i 7,5 (48).

#### 1.3.2.1. Epidemiologija

Gastroenteritis uzrokovan bakterijom *S. enterica* pretežno je bolest industrijaliziranih zemalja koja nastaje prilikom nepravilnoga rukovanja hranom, što omogućuje prijenos zaraze sa životinja na čovjeka. Bolest se razvija ingestijom 1000 ili više bacila salmonele, što otežava izravan prijenos s čovjeka na čovjeka, no za aklorhidrične pojedince ili one koji uzimaju antacide infektivna doza znatno je manja. Salmonele su vodeći uzročnici crijevnih infekcija u svijetu koje se prenose hranom. Proizvodi od peradi, uključujući jaja, najčešće su načini prijenosa infekcije gastroenteritisa (49). Od 1980-ih, javnozdravstvene službe širom svijeta izvještavaju o visokim incidencijama ljudskih infekcija *S. Enteritidis*. 2008. i 2009. godine u Sjedinjenim Američkim Državama *S. Enteritidis* bio je najčešći serotip salmoneloze u ljudi s više od 7000 slučajeva prijavljenih svake godine (50). Broj slučajeva varira sezonski - s najvećom incidencijom ljeti i u jesen. Najveće stope zaraze prisutne su kod djece mlađih od 5 godina, osobe u dobi između 20-30 godina i one starije od 70 godina. Ako je jedan član kućanstva zaražen, vjerojatnost da će se ostali ukućani zaraziti iznosi približno 60%. Gotovo trećina svih epidemija salmonele javlja se u staračkim domovima, bolnicama i ustanovama za mentalno zdravlje. Ljudi također mogu biti izvor bolesti, kao i kućni ljubimci. U 5% pacijenata oporavljenih od gastroenteritisa nakon 20 tjedana dokazana je prisutnost bacila *S. Enteritidis* i nakon 20 dana (49).

#### 1.4.1.2. Povezanost jaja i salmoneloze

Mikrobna kontaminacija ljuske jajeta može nastati izlaganjem izmetu i drugim izvorima okoliša prilikom polaganja jaja i neadekvatno saniranim objektima za preradu jaja. Patogeni, koji kasnije prežive proces obrade, mogu se unijeti u jestivi tekući sadržaj jajeta kada se ljuska lomi za upotrebu ili konzumaciju. Štoviše, ljuske jajeta su porozne i neučinkovito sprječavaju prodor bakterija u unutrašnjost s područja vlažne fekalne kontaminacije. Dvije temeljne membrane ljuske čine učinkovitiju prepreku, osim u slučajevima kada se odvajaju prilikom formiranja zračne komore na tupome kraju jajašca.

Kokoši se obično zaraze *S. Enteritidis* oralnim putem, što dovodi do kolonizacije nekoliko regija gastrointestinalnoga trakta (posebno jajovoda). Invazija kroz epitelne stanice sluznice omogućuje sustavno širenje na različite unutarnje organe, uključujući reproduktivna tkiva. *S. Enteritidis* pristupa unutrašnjem sadržaju jajeta koloniziranjem jajnika (mjesto sazrijevanja i oslobađanja žumanjka) i jajovoda (mjesto stvaranja bjelanjka). Kokoši nesilice obično proizvode interno inokulirana jaja samo nekoliko tjedana nakon oralne inokulacije. Prirodno inokulirana jaja sadrže vrlo mali broj *S. Enteritidis* neposredno nakon polaganja, a kod većine kontaminiranih jaja pronađeno je manje od 10 bacila *S. Enteritidis*. Inficirane kokoši salmonelu mogu odložiti u žumanjku ili bjelanjku (ponekad u oba), a sve ovisi o regiji koloniziranoga reproduktivnoga trakta. Analiza jaja, koja su položile i prirodno i eksperimentalno zaražene kokoši, pokazala je da se *S. Enteritidis* češće taloži u bjelančevinama ili na membrani vitelina (žumanjka) nego u unutrašnjem sadržaju žumanjka. Prema tome, inokulirana jaja sadrže mali broj salmonele jer bjelančevine nisu dobar medij za rast bakterija. Ta se činjenica može pripisati antibakterijskim bjelančevinama poput ovotransferina (koji veže željezo kako bi ograničio njegovu dostupnost mikroorganizmima) i povećanju pH prilikom starenja jajeta. Ipak, *S. Enteritidis* može preživjeti, a ponekad čak i polako rasti u bjelanjku. Žumanjak je bogat hranjivim sastojcima s odsustvom antimikrobnih bjelančevina te se salmonela može namnožiti na sobnoj temperaturi do visokih koncentracija unutar 24 h. *S. Enteritidis* brzo raste na sobnoj temperaturi i umjereno na 10 °C, ali rast prestaje na 4 °C ili niže. Prodiranje salmonele u žumanjke povećava se s vremenom skladištenja i temperaturom (50).

#### 1.4. *Campylobacter spp.*

Bakterije iz roda *Campylobacter*, uglavnom *C. jejuni* i *C. coli*, u svijetu su poznati kao najčešći uzročnici bakterijskih infekcija probavnoga sustava. Najčešće su izolirani crijevni patogeni te predstavljaju značajan javnozdravstveni problem. Kampilobakterioza je najčešća zoonoza koja se prenosi kontaminiranom vodom i hranom (51). Kampilobakteri su sitne zavinute, gram- negativne štapićaste bakterije veličine 0,2 - 0,5 µm. Kreću se poput „svrdla“ zahvaljujući polarnoj flageli na jednom ili oba kraja (52). Mikroaerofili su te im je za rast potrebna atmosfera 3-15% kisika te 5-0% CO<sub>2</sub>, a s obzirom na to da su termofilni najbolje rastu pri temperaturi inkubacije od 42 °C (53). Ne fermentiraju niti oksidiraju ugljikohidrate, već energiju dobivaju iz aminokiselina i međuprodukata ciklusa limunske kiseline (51).

### 1.5.1. Opće karakteristike

Kampilobakteri koji su uzročnici gastroenteritisa koloniziraju tanko i debelo crijevo te dovode do upalnoga proljeva praćenog povišenom temperaturom. Infektivna doza *C. jejuni* iznosi 800-1000 bakterija (51). Mehanizmi pomoću kojih *C. jejuni* uzrokuje bolest uključuju bakterijsku virulenciju i kolonizacijske čimbenike (koji sudjeluju u preživljavanju prolaska kroz želudac i tanko crijevo) te naknadnu kolonizaciju i rast u distalnom ileumu i debelome crijevu (54). Različiti mehanizmi virulencije koje pokazuju vrste kampilobaktera uključuju adheziju, invazivna svojstva, obranu od oksidativnoga stresa i proizvodnju toksina.

Pokretljivost je važna za preživljavanje kampilobaktera pod različitim uvjetima u gastrointestinalnom traktu (55). Funkcionalni bičevi, brza pokretljivost i spiralni oblik važni su čimbenici virulencije koji omogućuju brz i učinkovit prodor u sluznicu crijeva. Flagela kampilobaktera se sastoji od dva homološka flagelina, FlaB i FlaA - koji je odgovoran za prijanjanje, kolonizaciju gastrointestinalnoga trakta i invaziju stanica domaćina (53). Mehanizam pokretljivosti flagelama uključuje kemosenzorni sustav koji upravlja kretanjem bičeva ovisno o uvjetima okoline u kojima se bakterija nalazi. Kemotaksini su važni čimbenici virulencije koji pomažu dovesti kampilobakter do mjesta kolonizacije, a pomažu i u invaziji stanice domaćina. Kemotaksija je metoda ili sustav pomoću kojega pokretne bakterije osjete i kreću se u smjeru povoljnijih uvjeta (55). U probavnome sustavu čovjeka kao kemoatraktant djeluje niz tvari: mucin, L-serin, L-fukoza i druge, a kao kemorepelenti neke žučne kiseline (51). Funkcionalne flagele nisu bitni samo za pokretljivost kampilobaktera, već i za adheziju i invaziju stanica domaćina. Jednom na površini stanice gastrointestinalnoga trakta, nekoliko potencijalnih proteina identificirani su kao adhezivni proteini koji se vežu za određene komponente stanice domaćina. Iako mehanizam adherencije nije u potpunosti jasan, neke studije ukazuju kako proteini CadF i FlpA djeluju zajedno kako bi vezali epitelni glikoprotein fibronektin stanica domaćina, što pokreće aktivaciju signalnih putova GTP-aze, Rac1 i Cdc42, koji mogu dovesti do procesa koji posreduju ulaskom i/ili invazijom stanica domaćina (56). Iako je dokazana proizvodnja egzotoksina CDT (eng. *cytolethal-distending toxin*), njegova uloga u izazivanju proljeva još nije sasvim objašnjena (51). CDT egzotoksin široko je distribuiran u gram-negativnim bakterijama. To je najbolje opisan toksin kampilobaktera i smatra se važnim činiteljem njegove virulencije. Ovaj toksin uzrokuje zaustavljanje G2/M faze staničnog ciklusa unutar eukariotskih stanica, što direktno dovodi do

apoptoze stanica. Svi izolati *C. jejuni* posjeduju gene koji kodiraju CDT, međutim, ne proizvode ga sve bakterije iz roda *Campylobacter*.

Bakterije iz roda *Campylobacter* su polako rastuće bakterije koje za rast u laboratorijskim uvjetima zahtijevaju optimalnu temperaturu (37 °C) i mikroaerofilne atmosferske uvjete s približno 5% O<sub>2</sub> i 10% CO<sub>2</sub>. Izdvajanje kampilobaktera u laboratorijskim uvjetima izrazito je složeno i zahtijeva primjenu visokoselektivnih tekućih i krutih hranjivih podloga. Do danas je razvijen različiti broj metoda izdvajanja, određivanje broja i razlikovanje vrsta bakterija roda *Campylobacter*, a koji su primjenjivi u svakodnevnoj dijagnostici. Najčešće upotrebljavane hranjive podloge su: Bolton, Skirrow, Karmali, mCCDA (eng. *modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar*) te CAT (Engl. *cefoperazone amphotericin teicoplanin*). Navedene hranjive podloge kombinacija su različitih antimikrobnih tvari koje onemogućavaju rast nepoželjne mikroflore, poput: polimiksina, vankomicina, trimetoprima, rifampicina, cefoperazona itd. Hranjive podloge sadrže pepton, a većini se dodaje krv te različite tvari za vezanje slobodnoga kisika, poput H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (57).

#### 1.4.1. Epidemiologija

*C. jejuni* vodeći je uzročnik bakterijskoga gastroenteritisa u zemljama u razvoju i razvijenim zemljama. Izolira se češće od ostalih crijevnih patogena poput bakterija *Salmonella* i *Shigella*, a predstavlja značajan javnozdravstveni problem (51). Većina infekcija kampilobakterom su sporadične, a ljudi se najčešće zaraze konzumacijom kontaminirane hrane (posebno peradi) ili vode (56,58). Kampilobakterioza je najčešća bakterijska zoonoza uočena u većini regija svijeta. Toplokrvne životinje (sisavci i ptice) glavni su rezervoar kampilobaktera, a najčešće ga se može izolirati na farmama za uzgoj životinja, uključujući perad, svinje, goveda i ovce, kao i kućne životinje poput pasa i mačaka. Prisutnost kampilobaktera u ovih životinja obično je asimptomatska, a prijenos na čovjeka olakšava se rukovanjem i konzumacijom prehrambenih proizvoda životinjskoga podrijetla. Dokazano je kako se 50-70% sojeva kampilobaktera, povezanih s ljudskim infekcijama, može pripisati rezervoarima iz peradi (59). Smatra se da se broj slučajeva kampilobakterioze povećava na globalnoj razini, a postoje dokazi da se incidencija kampilobakterioze povećava u Europi s procjenom 30-50 slučajeva i u Sjevernoj Americi 14-15 slučajeva na 100000 stanovnika. U zemljama u razvoju djeca se zaraze u mladoj dobi, dok su infekcije u odraslih rjeđe (56). U razvijenim zemljama bolest se javlja u svim dobnim skupinama,

ali prevladava u novorođenčadi i male djece. Incidencija *C. jejuni* udvostručena je tijekom ljeta, što bi se moglo objasniti konzumiranjem neprikladno skladištenog i nedovoljno termički obrađenog mesa i proizvoda peradi. U SAD-u se procjenjuje da kampilobakter godišnje izazove oko 845 000 infekcija, 8500 hospitalizacija i 76 smrtnih slučajeva. Prijenos s osobe na osobu je rijedak, ali postoje slučajevi prijenosa unutar dječjih vrtića i obitelji, kao i perinatalni prijenos s majke na dijete (54). Prijenos kampilobakterioze može se znatno smanjiti edukacijom o osobnoj i kućnoj higijeni, izbjegavanjem kontakta s izmetom peradi i kanalizacijskom vodom te redovitim pranjem ruku (60). U Republici Hrvatskoj podaci o kampilobakteriozama izdvojeno se prate od 2009. godine, od kada se i obavezno prijavljuju u okviru usklađivanja s načinom praćenja unutar Europske unije. Tijekom 2015. godine u RH je prijavljeno 1393 oboljelih od kampilobakterioze, dok je 2016. godine taj broj iznosio 1547. Stopa prijavljivanja kampilobakterioze u RH u 2015. godini iznosila je 32,97 na 100 000 stanovnika (61).

#### 1.5.4. Kampilobakteri u peradi

Kokoši se kampilobakterom zaraze fekalno-oralnim putem, nakon čega se kolonizira u probavnome sustavu s velikim bakterijskim opterećenjem. Utvrđeno je da, nakon što se kokoš zarazi kampilobakterom, prijenos se odvija brzo između kokoši, što rezultira potpunom infekcijom cijeloga jata u roku od nekoliko dana. Glavno mjesto kolonizacije je slijepo (lat. *caeca*) i tanko crijevo te u manjoj mjeri jetra i slezena. Kampilobakter je moguće izolirati i iz krvotoka, što ukazuje na njegov potencijal za brzu distribuciju u druga tkiva i organe. Uspješnost brze kolonizacije probavnog sustava omogućeni su mu različitim mehanizmima patogenosti i virulencije koji su prethodno opisani, a oni obuhvaćaju brzu replikaciju u crijevnoj sluzi i invaziju crijevnoga epitela kako bi se izbjegao klirens sluznice (62). Istraživanja pokazuju da infekcija kampilobakterom inducira višak stvaranja sluzi u crijevima, što posljedično stvara veću viskoznost crijevnog sadržaja zaražene peradi (63). Na kolonizaciju crijeva mogu utjecati mnogi čimbenici kao što su starost ptica, bakterijski soj i genotip ptica. S obzirom na to da je *C. jejuni* osjetljiv na isušivanje, njegovo preživljavanje na površini jaja izrazito je teško. Međutim, pretpostavlja se kako *C. jejuni* ima mogućnost prodiranja kroz ljusku i membranu jajeta prilikom njegovoga hlađenja, pri čemu se jaje skuplja. Skupljanje jajeta rezultira negativnim tlakom koji može uvući bakteriju kroz ljusku i njene membrane (64).

## 2. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je ispitati mikrobiološku čistoću i prisutnost bakterija *Salmonella spp.* i *Campylobacter spp.* na domaćim kokošjim jajima iz slobodnoga uzgoja te preživljavanje bakterije *Salmonella* Enteritidis pri različitim temperaturama čuvanja jaja. Jaja su prikupljena iz malog proizvodnog objekta OPG Radojković.

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Materijali

- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotip Enteritidis, ATCC, Virginia, SAD
- Brain heart infusion broth, Biolife, Milano, Italija
- GN broth (Hajna), Biolife, Milano, Italija
- XLD agar, Biolife, Milano, Italija
- Kvaščev ekstrakt, Biolife, Milano, Italija
- Campylobacter agar base (Karmali), CM0935, OXOID LTD, Hampshire, Engleska
- Puferirana Peptonska voda (PPV)
- Jaja domaćih kokoši, OPG Radojković, Tomašanci, Hrvatska
- Biokemijski niz

##### 3.1.1. Laboratorijski pribor i oprema

- Kabinet BIO-II-A model TE, Barcelona, Španjolska
- Vorteks, Technokartell TK3S, Australija
- Spektrofotometar/BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Njemačka
- Inkubator BD 240, Binder, Gleisdorf, Austrija
- Termostat Bacto BTE-S 2, Termo-medicinski aparati, Dugo Selo, Hrvatska
- CO<sub>2</sub> - inkubator, Memmert, Njemačka
- Sterilni brisni štapići, Coppan, Italija
- Automatske pipete, Eppendorf, Hamburg, Njemačka
- Automatske pipeta, Gilson, Middleton, SAD
- Mikroaerofilne vrećice GENbox microaer, bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francuska
- Stakleno laboratorijsko posuđe (epruvete, čaše od 200 mL, stakleni štapići)
- Plastični laboratorijski materijal (epruvete od 50 i 15 mL, posudice za urin od 100 mL, petrijeve zdjelice, jednokratne sterilne mikrobiološke ušice)
- Ostali laboratorijski pribor (metalne žlice i pincete, tarionik s tučkom, gas-pak)

### 3.1.3. Uzorci jaja

U ovome istraživanju obrađeni su uzorci jaja s područja Osječko – baranjske županije. Prikupljena su iz OPG - a Radojković, a proizvedena su slobodnim uzgojem od domaćih kokoši. Jaja su uzorkovana neposredno nakon polaganja, a čuvana su u hladnom i tamnom prostoru, kako bi bila zaštićena od vanjskih utjecaja prije analize.

### 3.1.4. Uzorci bakterija

U ovome radu korištena je bakterija *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotip Enteritidis ATCC, SAD. Bakterije se komercijalno nabavljaju liofilizirane u bočicama s čepovima od butilne gume te se čuvaju na temperaturi 4-8 °C. Kultivacija bakterija provodi se prema uputama proizvođača. Iz bujona (5-6 mL) koji je propisan od strane proizvođača, uzme se alikvot od 1 mL te se prenese u bočicu s liofiliziranim bakterijama. Potrebno je rehidrirati cijeli sadržaj bočice te isti aseptički vratiti natrag u bujon i dobro promiješati. Uzima se nekoliko kapi suspenzije i nasadije na krutu podlogu. Podloga se inkubira na 37 °C kroz 24 sata.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Priprema hranjivih podloga

#### 3.2.1.1. Agar s kvaščevim ekstraktom

Za pripremu hranjive podloge koristi se Kvaščev ekstrakt (eng. Yeast Extract) proizvođača Biolife, Italija. Na tehničkoj vagi potrebno je odvagati praškastu dehidriranu podlogu te dodati destiliranu vodu ovisno o tome koja se količina podloge želi dobiti. Smjesu je potrebno suspendirati, a zatim kuhati 10 minuta. Tijekom kuhanja potrebno je povremeno miješati sadržaj, a nakon kuhanja otopljenu podlogu potrebno je ohladiti i izliti u petrijeve zdjelice.

#### 3.2.1.2. XLD agar

Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) agar priprema se pomoću suhe suspenzije XLD agara proizvođača Biolife, Italija. Potrebno je suspendirati 54,9 g suhoga praha u 1000 mL hladne destilirane vode i zagrijavati do vrenja uz povremeno miješanje. Pripremljeni agar nije potrebno autoklavirati, a hladi se do temperature 50 °C pri pH 7,4 ± 0,2, nakon čega se prelije u sterilne petrijeve zdjelice. Uzorci nasadeni na agar inkubiraju se 18-24 h na temperaturi od 37 °C. *Salmonella spp* na XLD agaru raste u obliku crvenih kolonija sa ili bez crnih središta.



### 3.2.1.2. Karmali agar

Karmali agar selektivni je medij za izolaciju bakterija *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* kada se inkubiraju na temperaturi od 42 °C. Karmali agar priprema se pomoću suhe baze agara prema uputama proizvođača Oxoid, Engleska. U 21 mL destilirane vode dodaje se 21,5 g baze agara *Campylobacter* (Karmali) te se pusti da zavrije i otopi u potpunosti. Pripremljena se otopina sterilizira autoklavom pri temperaturi od 121 °C tijekom 15 minuta, a zatim se aseptično doda selektivni dodatak za kampilobakter (eng. *Campylobacter* Selective Supplement) i rekonstruira prema uputama. Tako pripremljeni agar ohladi se na 50 °C te se sterilno ulije u petrijeve zdjelice. Uzorci nasadeni na agar inkubiraju se u mikroaerofilnoj atmosferi na 42 °C kroz 48 sati.

### 3.2.1.3. BHI bujon

Brain Heart Infusion (BHI) bujon obogaćeni je neselektivni tekući medij koji se koristi za uzgoj širokog spektra bakterija. BHI bujon priprema se pomoću suhe suspenzije prema uputama proizvođača Biolife, Italija. Potrebno je suspendirati 37 g suhoga praha u 1000 mL hladne destilirane vode te ga zagrijavati do potpunog otapanja. Pripremljena otopina se zatim autoklavira na 121 °C tijekom 15 minuta. Ispitivani uzorak inokulira se sterilnom mikrobiološkom ušicom ili pipetom u bujon te se čuva u odgovarajućem vremenu, temperaturi i atmosferi ovisno o uzorku i/ili zahtjevima mikroorganizma koji se želi dokazati.

### 3.2.1.4. GN bujon (Hajna)

GN bujon (Hajna) tekući je medij spreman za obogaćivanje gram negativnih mikroorganizma, posebno bakterija *Salmonella spp.* i *Shigella spp.* GN bujon priprema se pomoću suhe suspenzije prema uputama proizvođača Biolife, Italija. Suspendira se 39 g suhog praha u 1000 mL hladne destilirane vode te se zagrijava dok se suspenzija u potpunosti ne otopi. 10 mL suspenzije prenese se u sterilne epruvete te se autoklavira na 121 °C tijekom 15 minuta. U bujon se inokulira 1 g ili 1 mL ispitivanog uzorka, dok se uzorci briseva mogu dodati izravno. Uzorak je potrebno temeljito homogenizirati te inkubirati u aerobnim uvjetima 6 – 8 sati na temperaturi 35-27 °C. Nakon inkubacije, sadržaj bujona se nacjepljuje mikrobiološkom ušicom (u sterilnim uvjetima) na selektivne podloge koje se inkubiraju na 35-37 °C kroz 24 sata.

### 3.2.1. Analiza mikrobiološke čistoće jaja

Mikrobiološka čistoća jaja određivala se na svježe položenim domaćim jajima iz slobodnog uzgoja. Jaja su se prikupljala neposredno nakon polaganja i skladištila u tamnom i hladnome prostoru kroz 3 dana prije same analize. Za analizu je bilo potrebno 42 (14 x 3) jaja koja su bila podijeljena i čuvana pri temperaturama od 4 °C, 21 °C i 37 °C. Brisnim štapićem prebrisana je ½ jaja 0., 3., 5., 8., 10., 12. i 14. dan. Za nulti dan prebrisan je uzorak jaja neposredno prije inkubacije pri određenoj temperaturi. Tijekom razdoblja od 14 dana praćen je porast ukupnih bakterija te prisutnost bakterije *Salmonella spp.* i *Campylobacter spp.*

#### 3.2.1.1. Metoda određivanja broja ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija

- Za brojanje ukupnih mikroorganizama koristi se agar s kvašćevim ekstraktom.

**Priprema uzorka:** Određivanje ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija provodi u sterilnim uvjetima. Prebriše se površina ½ jaja koja su inkubirana na 4 °C, 21 °C i 37 °C sterilnim brisnim štapićem koji se prenese u 1 mL fiziološke otopine te se dobro vorteksira. Tako se dobiva osnovno razrjeđenje. Dalje se po potrebi rade deseterostruka razrjeđenja.

**Nasađivanje na agar:** Postupak se odvija u sterilnim uvjetima. 0,5 mL uzorka prenese se sterilnom pipetom u petrijevu zdjelicu i zalije s 10-12 mL agara ohlađenog na temperaturi od 45 °C. Uzorak se pomiješa s agarom te se ostavi da očvrstne. Na agar se nasađuju sva pripremljena razrjeđenja, a za određivanje broja bakterija koristi se ono razrjeđenje u kojemu broj poraslih kolonija na ploči iznosi 15 – 300.

**Inkubacija i brojanje:** Petrijeve zdjelice se inkubiraju u termostatu na temperaturi 37 ± 1°C kroz 72 sata. Nakon inkubacije ploče se pregledavaju i izbroje se porasle kolonije.

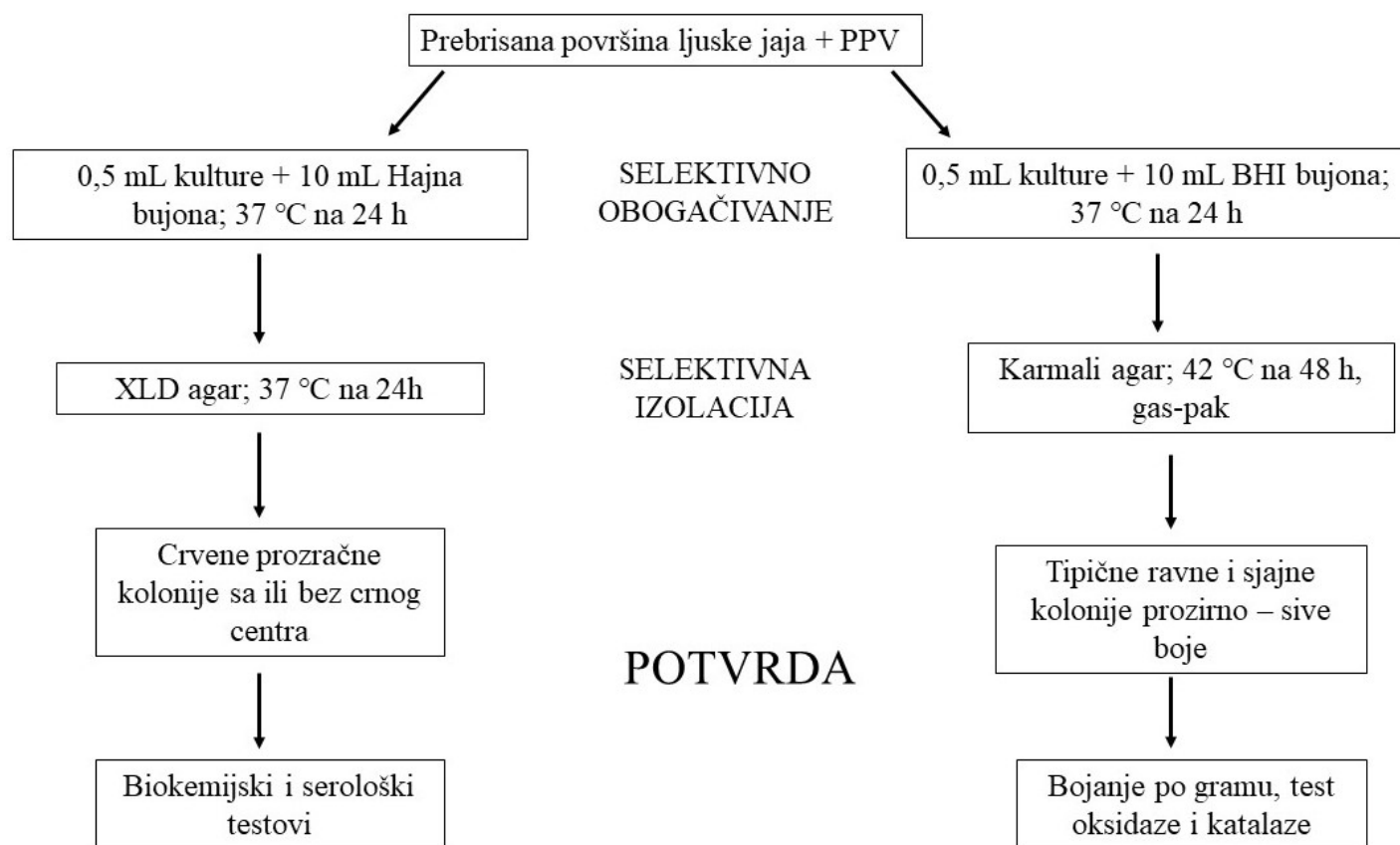
#### 3.2.1.2. Dokazivanje bakterije *Salmonella spp.* i *Campylobacter spp.*

**Priprema uzorka:** U sterilnim uvjetima prebriše se ½ površine jaja koja su inkubirana na temperaturama 4 °C, 21 °C i 37 °C sterilnim brisnim štapićem koji se prenese u 1 mL PPV-a te se dobro homogenizira na vorteksu.

**Selektivno obogaćivanje:** 0,5 mL uzorka osnovnog razrjeđenja prenese se sterilnom pipetom u 10 mL Hajna bujona, a preostala 0,5 mL prenese se u BHI bujon. Inkubacija Hajna i BHI bujona provodi se na temperaturi od 37 °C na 24 h.

**Selektivna izolacija:** Iz selektivnog bujona sterilnom jednokratnom mikrobiološkom ušicom (u sterilnim uvjetima) precjepljuje se na XLD agar i Karmali agar u tri poteza. XLD agar inkubira se na 37 °C/ 24h, a Karmali agar pri 42 °C na 24-48 h u mikroaerofilnoj atmosferi (gas-pak).

**Potvrda:** Na svakoj ploči pregledavaju se porasle kolonije. *Salmonella spp.* na XLD agaru raste u obliku crvenih prozračnih kolonija sa ili bez crnoga centra. Za karakteristične ili sumnjive kolonije vrši se biokemijska i serološka potvrda. *Campylobacter spp.* na Karmali agaru raste u obliku tipičnih ravnih, sjajnih kolonija prozirno – sive boje. Karakteristične kolonije mogu se potvrditi bojanjem po gramu te testovima oksidaze i katalaze.



Slika 4. Shematski prikaz određivanja bakterije *Salmonella spp.* i *Campylobacter spp.*

(izvor: vlastita slika)

### 3.2.2. Preživljavanje *S. Enteritidis* na površini ljuske jaja

U drugome dijelu ovoga istraživanja pratila se kinetika rasta i preživljavanje *S. Enteritidis* na površini jaja, a zatim i njezina uspješnost penetracije kroz ljusku u unutrašnji sadržaj jaja pri temperaturi od 4 °C i 21 °C tijekom 21 dan. Jaja su razbijena 10., 12., 15., 18. i 21. dan te je analizirana uspješnost penetracije *S. Enteritidis* u unutrašnji sadržaj jaja (unutrašnjost ljuske, bjelanjak i žumanjak).

**Priprema uzorka:** Jaja su prikupljena neposredno nakon polaganja te čuvana u tamnom i hladnome prostoru. Jaja su očišćena od nepoželjnoga sadržaja (izmet, slama) vlažnim papirnatim ubrusom, a zatim su sterilizirana UV lampom. Sterilizacija UV lampom provodila se 20 minuta unutar kabineta Bio-II-A model TE, Španjolska.

**Priprema bakterijske suspenzije:** U ovom istraživanju korišten je soj bakterije *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotip Enteritidis proizvođača ATTC, SAD. Kultura bakterija pripremljena je prema ranije spomenutom protokolu prema uputama proizvođača.

S hranjive podloge sterilnom mikrobiološkom ušicom uzme se nekoliko kolonija *S. Enteritidis* te se prenese u 150 mL fiziološke otopine. Nakon toga se broj bakterija odredio pomoću spektrofotometra, a optička gustoća (optical density) podešena je na OD1, što odgovara koncentraciji bakterija od  $1 \times 10^9$  CFU/mL. Zatim je napravljeno razrjeđenje od  $1 \times 10^7$  CFU/mL.

Potom, svježa sterilizirana jaja uronjena su u suspenziju bakterijske kulture *S. Enteritidis* (u sterilnim uvjetima) na 2 minute, nakon čega su, pomoću steriliziranih metalnih laboratorijskih žlica, prenesene u sterilne čašice za urin te pohranjene na temperaturama od 4 °C i 21 °C.

Tijekom 21 dan praćen je porast bakterije *S. Enteritidis* na površini jaja. Prebrisana je ½ jaja sterilnim brisnim štapićem koji je prenesen u 1 mL fiziološke otopine, pri čemu se dobije osnovno razrjeđenje, a po potrebi su rađena deseterostruka razrjeđenja kako bi porast na hranjivoj podlozi bio između 15-300 kolonija. Tako pripremljeni uzorci nanosili su se na selektivnu podlogu XLD agar i inkubirali na temperaturi 37 °C kroz 24 sata. Nakon inkubacije broje se porasle karakteristične kolonije crvene boje sa ili bez crnog centra.

10., 12., 15., 18., i 21. dan jaja su razbijena i dokazivana je uspješnost penetracije *S. Enteritidis* u unutrašnji sadržaj jaja. Prisutnost *S. Enteritidis* na unutrašnjosti ljuske analizirana je prema prema već spomenutom protokolu, dijagram 1. Prisutnost salmonele u žumanjku i bjelanjku

provodila se na način da se uzme 1 mL sadržaja bjelanjka i žumanjka sterilnom pipetom te se prenese u 1 mL Hajna bujona, sadržaj se dobro vorteksira i bujon se inkubira na 37 °C kroz 24 sata. Sadržaj bujona se zatim sterilnom mikrobiološkom ušicom u tri poteza nanosi na XLD agar koji se inkubira na temperaturi od 37 °C kroz 18-24 sata. Nakon inkubacije broje se porasle karakteristične kolonije crvene boje sa ili bez crnog centra.

### 3.2.3. Statistička obrada podataka

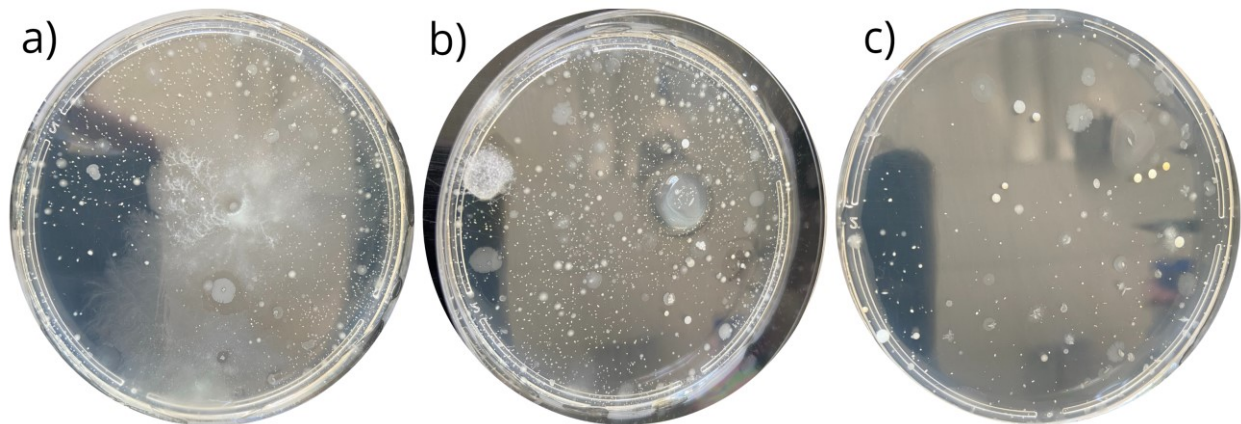
Za statističku obradu korišten je program Statistica® v.12. Normalnost distribucije svih parametara je utvrđena. Uzorci su analizirani neparametrijskim Mann-Whitney U-testom. Razina od  $p < 0.05$  smatrana je statistički značajnom.

## 4. REZULTATI

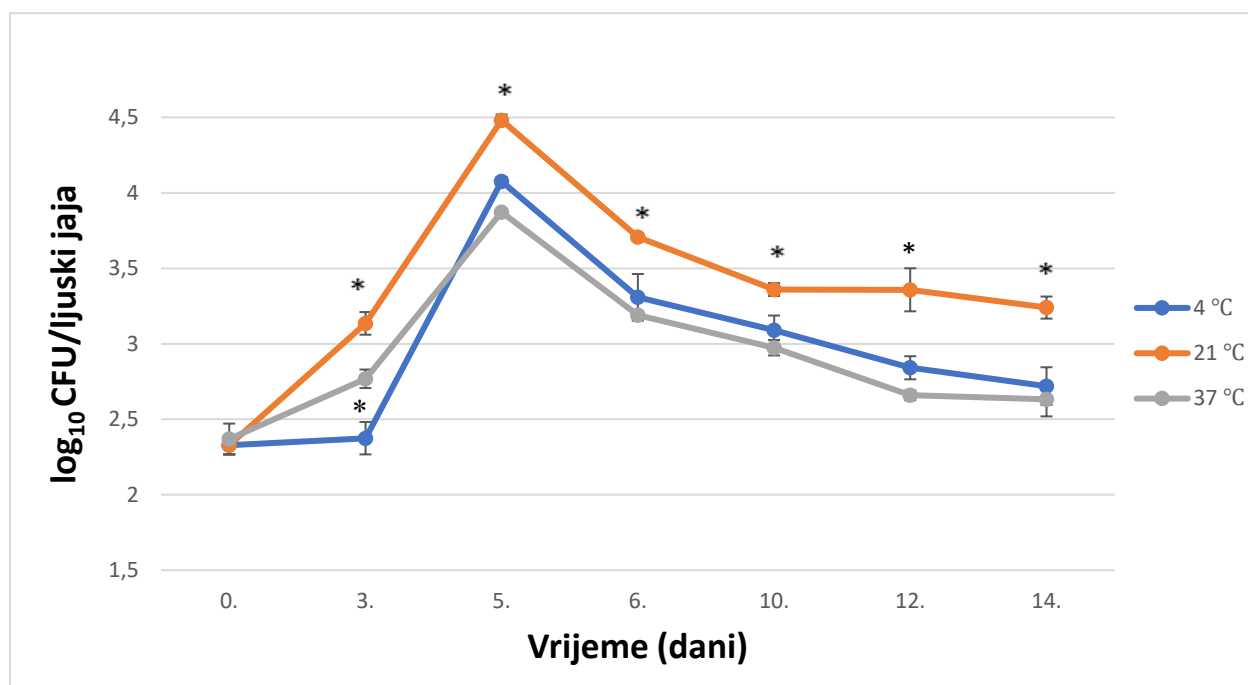
### 4.1. Analiza mikrobiološke čistoće domaćih jaja iz slobodnog uzgoja

U prvome dijelu ovoga eksperimentalnog rada ispitan je porast ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija na površini ljuske jaja pri temperaturama inkubacije od 4 °C, 21 °C i 37 °C. Utjecaj temperature na razmnožavanje ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija praćen je u vremenskome razdoblju od 14 dana.

Domaća jaja iz slobodnog uzgoja prikupljena su neposredno nakon polaganja te čuvana na hladnom i tamnome mjestu prije same analize. Porast ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija praćen je u nekoliko vremenskih točaka (0., 3., 5., 8., 10., 12. i 14. dan). Prebrisana je ½ jaja te nasadana na agar s kvašćevim ekstraktom, nakon čega su se brojale porasle kolonije. Porast bakterija na površini ljuske jaja prebrisanih 0. dana predstavljao je početnu koncentraciju koja je iznosila log 2.3 CFU/ljuski jaja. Jaja su zatim inkubirana pri temperaturama 4 °C, 21 °C i 37 °C te se u navedenim vremenskim točkama pratio porast kolonija ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija. Unutar 5 dana zabilježen je porast ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija pri svim temperaturama, a broj izbrojanih kolonija na kvašćevom agaru bio je najveći 5. dana analize, gdje je broj poraslih kolonija iznosio log 4.08 CFU/ljuski jaja pri temperaturi od 4 °C, log 4.48 CFU/ljuski jaja pri 21 °C i log 3.87 CFU/ljuski jaja pri temperaturi od 37 °C (slika 5 i 6). Nakon 5. dana zabilježen je značajan pad broja ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija, a zadnji dan analize (14. dan) porast kolonija iznosio je log 2.72 CFU/ljuski jaja pri temperaturi od 4 °C, log 3.36 CFU/ljuski jaja pri 21 °C i log 2.63 CFU/ljuski jaja pri temperaturi od 37 °C (slika 6).



Slika 5. Prikaz kolonija ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija poraslih nakon 5 dana inkubacije pri temperaturi od 4 °C (a), 21°C (b) i 37 °C (c).

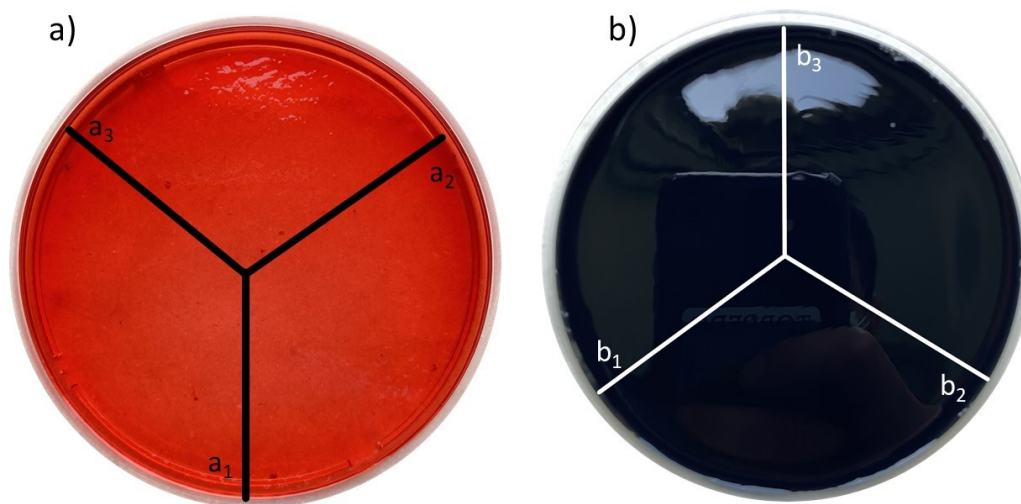


\* - statistička značajnost ( $p < 0.05$ )

Slika 6. Kinetika rasta ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija na površini ljuske jaja pri različitim temperaturama inkubacije (4 °C, 21 °C i 37 °C) tijekom promatranog perioda od 14 dana.

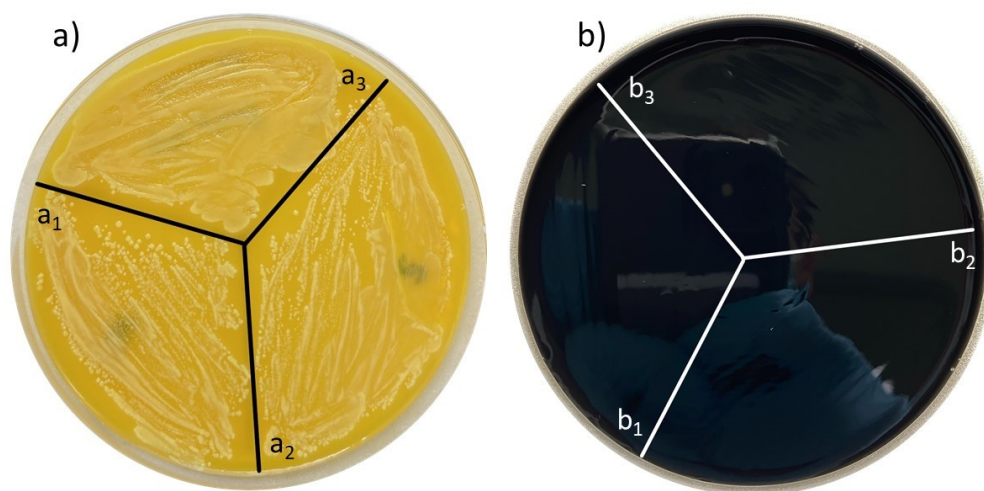
Kako bi se ispitala razlika u porastu ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija pri različitim temperaturama čuvanja jaja, provedena je statistička analiza neparametrijskim Mann -Whitney U testom na razini značajnost ( $p < 0.05$ ) između temperatura čuvanja od 4 °C i 21 °C. Statističkom analizom utvrđeno je da se podaci, kroz razdoblje od 14 dana, u svim točkama analize porasta ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija statistički značajno razlikuju, što je vidljivo na slici 6. Međutim, između temperatura čuvanja od 4 °C i 37 °C tijekom promatranog razdoblja od 14 dana nije bilo statistički značajne razlike u broju bakterija ( $p > 0.05$ ), osim 3. dana ( $p < 0.05$ ).

U analiziranim uzorcima površine ljuske jaja, koja su bila inkubirana pri temperaturama 4 °C, 21 °C i 37 °C, nisu izolirane *Salmonella spp.* i *Campylobacter spp.* Površine od ½ jaja prebrisane su 0., 3., 5., 8., 10., 12. i 14. dan, a uzroci su se selektivno obogaćivali i nacijepeljivali na selektivne hranjive podloge (slika 7).



Slika 7. Negativan porast bakterije *Salmonella spp.* na XLD agaru (a) i *Campylobacter spp.* na Karmali agaru (b) nakon inkubacije pri temperaturama 4 °C (a<sub>1</sub>, b<sub>1</sub>), 21°C (a<sub>2</sub>, b<sub>2</sub>) i 37 °C (a<sub>3</sub>, b<sub>3</sub>).

Ispitani su uzorci svježeg izmeta kokoši i gnijezda za polaganje jaja unutar 24 h nakon uzorkovanja. Uzorci su selektivno obogaćeni i nacijepljeni na selektivne hranjive podloge. Analizom nije dokazano prisustvo bakterije *Salmonella spp.* i *Campylobacter spp.* (slika 8).



Slika 8. Negativan porast bakterije *Salmonella spp.* na XLD agaru (a) i *Campylobacter spp.* na Karmali agaru (b) u izmetu (a<sub>1</sub>, b<sub>1</sub>), gnijezdu 1 (a<sub>2</sub>, b<sub>2</sub>) i gnijezdu 2 (a<sub>3</sub>, b<sub>3</sub>).

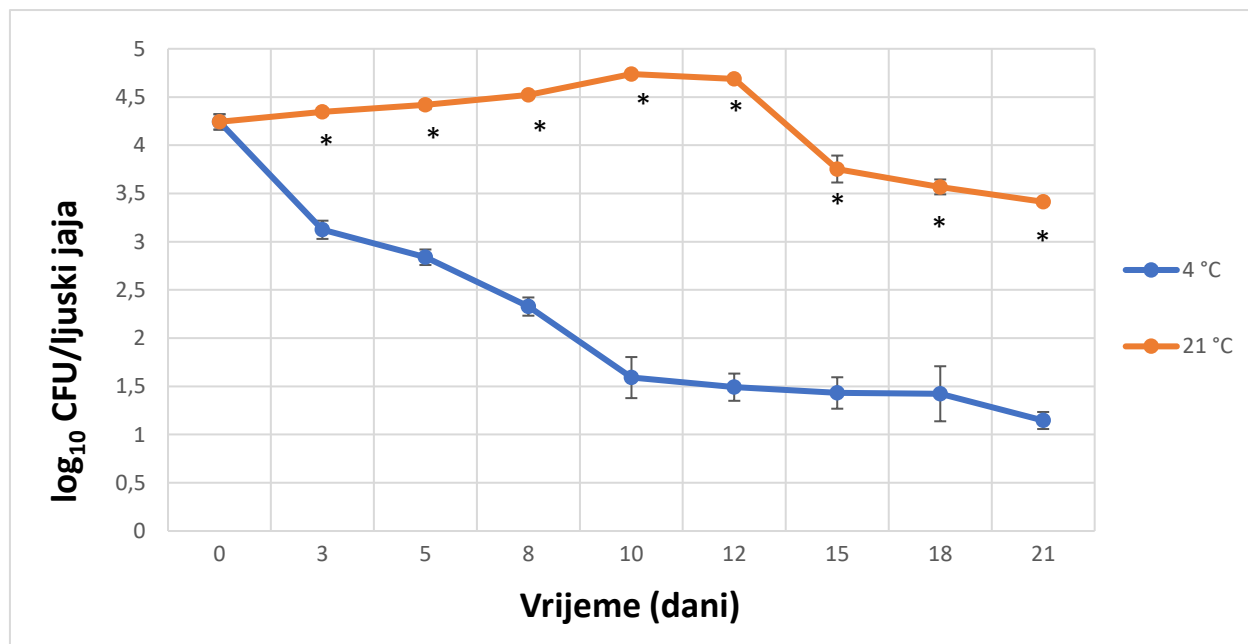


## 4.2. Preživljavanje *S. Enteritidis* na površini ljuske jaja

U drugome dijelu ovog eksperimentalnog rada ispitano je preživljavanje *S. Enteritidis* na površini ljuske jaja. Neposredno nakon inokulacije *S. Enteritidis* prebrisana je ½ površine ljuske jaja, a pripremljeni uzorak nasaden je na XLD agar kako bi se odredila početna koncentracija bakterija na površini ljuske. XLD agar je potom inkubiran na temperaturi 37 °C kroz 24 sata, a broj bakterija očitao je nakon navedenog razdoblja te je iznosio 10<sup>4</sup> CFU/ljuski jaja.

Jaja su nakon inokulacije sa *S. Enteritidis* inkubirana pri temperaturama od 4 °C i 21°C, a broj bakterija na površini praćen je tijekom 21 dan.

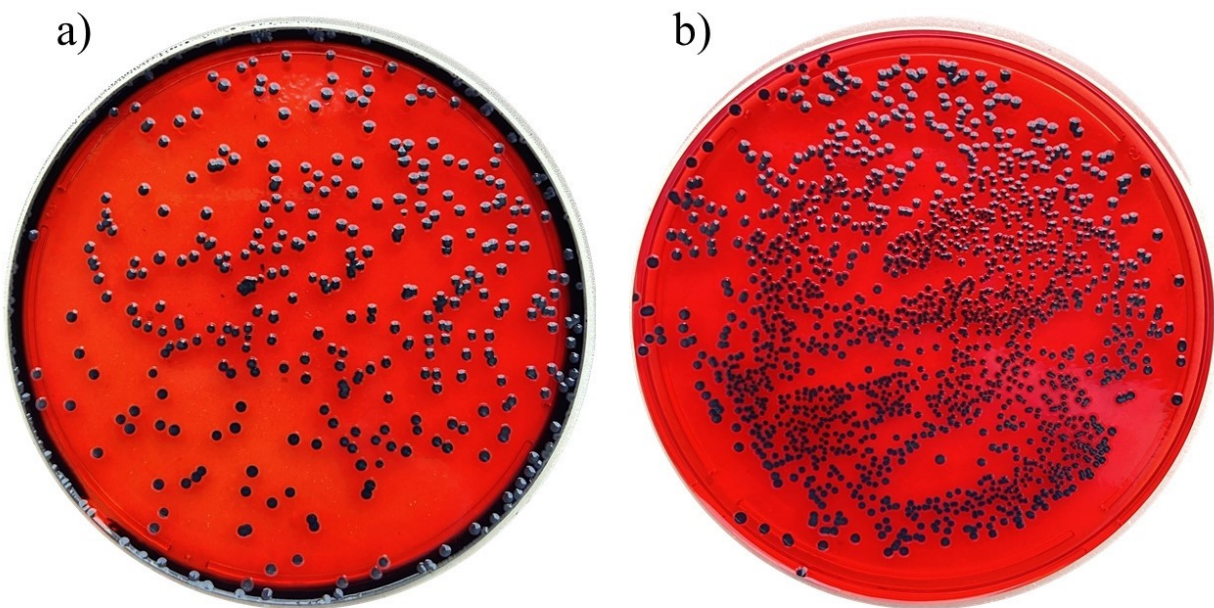
Na XLD agaru, na kojega je nasaden uzorak prebrisane površine jaja pri temperaturi od 4 °C unutar 21 dana ispitivanja, zabilježen je kontinuiran pad broja bakterije *S. Enteritidis*. Treći dan nakon inokulacije očitao je broj bakterija od log 3.12 CFU/ljuski jaja, 8. dan broj bakterija iznosio je log 2.33 CFU/ljuski jaja dok je 21. dan, koji je bio i zadnji dan analize, porasli broj bakterija iznosio je log 1.15 CFU/ ljuski jaja (slika 9).



\* - Statistička značajnost (p<0.05)

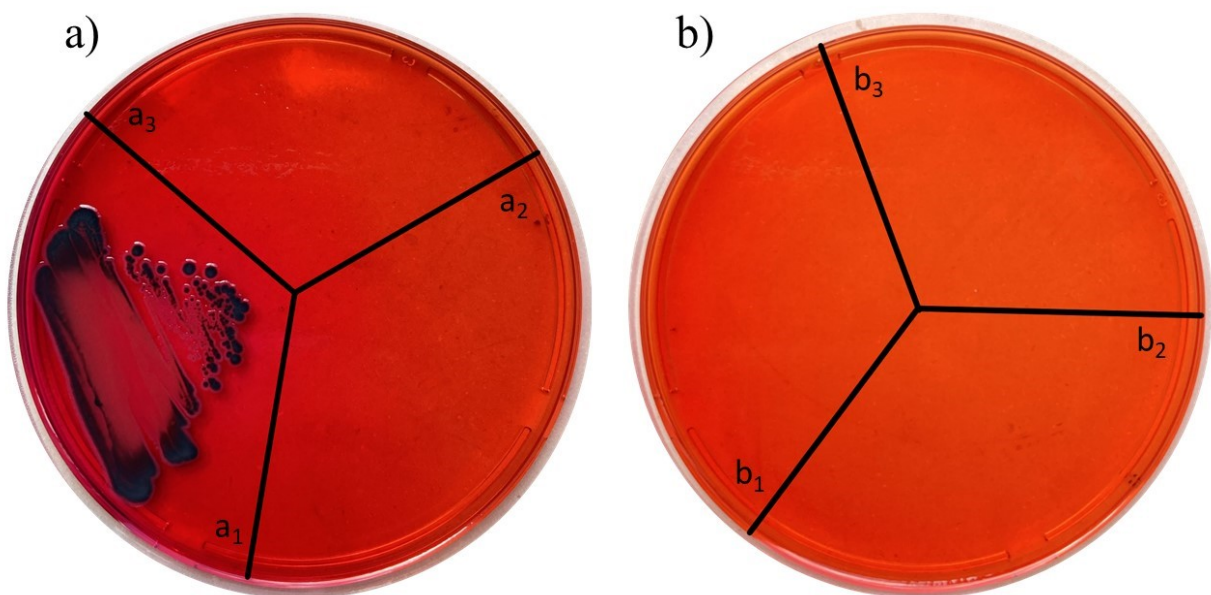
Slika 9. Kinetika rasta *S. Enteritidis* na površini ljuske jaja pri različitim temperaturama inkubacije (4 °C i 21 °C) tijekom promatranog perioda od 14 dana.

Na slici 9 može se primijetiti značajan porast *S. Enteritidis* na površini ljuske jaja prvih 10 dana nakon inkubacije pri temperaturi od 21 °C. Treći dan očitano je broj bakterija od log 4.35 CFU/ljuski jaja, dok je osmi dan broj bakterija iznosio log 4.5 CFU/ljuski jaja. Najveći porast broja *S. Enteritidis* zabilježen 10. dan i iznosio je log 4.74 CFU/ljuski jaja, dok je nakon 10. i 12. dana zabilježen nagli pad rasta *S. Enteritidis*. Petnaesti dan analize očitano je porast od log 3.75 CFU/ljuski jaja, a zadnji dan (21. dan) broj je iznosio 3.41 CFU/ljuski jaja. Statističkom analizom utvrđena je statistički značajna razlika u broju bakterija na površini ljuske jaja pri temperaturi inkubacije od 21 °C u odnosu na 4 °C tijekom cijeloga promatranoga razdoblja ( $p < 0.05$ ) (slika 9 i 10).



Slika 10. Prikaz poraslih kolonija *S. Enteritidis* 5. dan inkubacije pri temperaturama od 4 °C (a) i 21°C (b).

Jaja inokulirana sa *S. Enteritidis* i inkubirana pri temperaturama od 4 °C i 21°C razbijena su 10., 12., 15., 18., i 21. dan s ciljem utvrđivanja sposobnosti prodiranja *S. Enteritidis* u unutrašnji sadržaj jaja (unutrašnja strana ljuske, žumanjak i bjelanjak). Kod jaja inkubiranih pri temperaturi od 21 °C zabilježeno je prodiranje 15., 18. i 21. dan, a prisutnost bakterije dokazana je samo na unutrašnjosti ljuske jaja, dok u žumanjku i bjelanjku nije izolirana tijekom 21 dan analize. S druge strane, pri temperaturi od 4 °C salmonela u unutrašnjem sadržaju jaja nije dokazana niti u jednome vremenskome razdoblju (slika 11).



Slika 11. Prikaz porasta *S. Enteritidis* u unutrašnjem sadržaju jaja 15. dan nakon inkubacije pri temperaturama 4 °C (a) i 21°C (b). Unutrašnjost ljuske (a<sub>1</sub>, b<sub>1</sub>), bjelanjak (a<sub>2</sub>, b<sub>2</sub>) i žumanjak (a<sub>3</sub>, b<sub>3</sub>).

## 5. RASPRAVA

U današnje vrijeme kokošja jaja su nesumnjivo jedan od najzastupljenijih prehrambenih proizvoda u ljudskoj prehrani, a tijekom posljednjega desetljeća zabilježen je značajan porast njihove upotrebe u različitim vrstama prehrambenih proizvoda. Globalno gledano, kokošja jaja su jedna od glavnih komponenata ljudske prehrane koja služi kao izvor proteina, masti i drugih hranjivih sastojaka koji su neophodni za očuvanje ljudskoga zdravlja. Hrana životinjskoga podrijetla, posebice meso i jaja kokoši, smatraju se potencijalnim uzročnikom salmoneloze i kampilobakterioze u ljudi. Široko je poznato da su kokoši značajan rezervoar infekcija salmonele i kampilobaktera u čovjeka zbog njihove sposobnosti da se razmnožava u gastrointestinalnome traktu, a potom preživljava na komercijalno prerađenome mesu i jajima.

Do danas su provedene brojne studije o mikrobiološkoj čistoći i prisutnosti patogena *Salmonella spp.* i *Campylobacter spp.* u danas sve češće prihvatljivijem načinu slobodnog uzgoja jaja kokoši nesilica. Studije su također potvrdile mehanizme kontaminacije i preživljavanja bakterije *Salmonella spp.* na kokošnjim jajima te glavne puteve njegovog prijenosa među ljudima.

U prvom dijelu ovoga rada praćen je porast ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija na površini ljuske kokošnjih jaja iz slobodnog uzgoja tijekom 14 dana na temperaturama 4 °C, 21 °C i 37 °C. Neposredno prije inkubacije ukupan broj ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija iznosio je log 1.92 CFU/ljuski jaja, a najveći porast zabilježen je 5. dan inkubacije, gdje je pri 21 °C iznosio log 4.48 CFU/ljuski jaja, log 4.08 CFU/ljuski jajeta pri temperaturi od 4 °C, a pri 37 °C log 3.87 CFU/ljuski jaja. Očekivano, najznačajniji porast ( $p < 0.05$ ) zabilježen je pri temperaturi čuvanja od 21 °C (Slika 6). U istraživanju Moyle i suradnika analiziran je broj ukupnih aerobnih mezofilnih bakterije na površini ljuske jaja dostavljenih s dvije farme slobodnoga uzgoja kokoši. Prosječna količina bakterija, izoliranih s površine ljuske jaja s farme 1 tijekom studije, bila je 3.84 log CFU/ljuski jaja i 3.69 log CFU/ljuski jaja za farmu 2 (65). Broj ukupnih bakterija značajno je viši u odnosu na rezultate dobivene u ovome radu (log 2.3 CFU/ljuski jaja), a mogući razlog tome je taj što su jaja u ovome istraživanju prikupljena neposredno nakon polaganja, pri čemu je smanjeno vrijeme za kontaminaciju ljuske jaja bakterijama. Park i sur. ispitali su porast ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija na površini kokošnjih jaja uzrokovan različitim temperaturama, vlagom i prisutnosti kokošnjeg izmeta. Ispitali su jaja koja su se distribuirala na lokalnoj tržnici na sobnoj temperaturi ( $20 \pm 5$  °C) te oprana jaja pohranjena na temperaturi hladnjaka (4 °C) koja su distribuirana u

modernome supermarketu. Izvijestili su kako je upravo značajno veća ( $p < 0.05$ ) prisutnost bakterija na površini ljuske jaja koja su distribuirana na lokalnim tržnicama u odnosu na jaja distribuirana u modernim supermarketima. Sunhyung i sur. navode da se smanjenje broja ukupnih mezofilnih bakterija na površini ljuske jaja distribuiranih u supermarketima pripisuje uklanjanju organskog materijala koji sadrži mikroorganizme, što je rezultat pranja kokošnjih jaja vodom prije distribucije i sprječavanja rasta tijekom skladištenja u hladnjacima (66). Rezultate su potvrdili Pesavento i sur. koji su ispitivali kontaminaciju jaja iz slobodnoga i organskog uzgoja aerobnim mezofilnim bakterijama te različitim čovjekovim patogenima. Izvijestili su kako su analizirana jaja iz slobodnoga i organskog uzgoja imali najveće bakterijsko opterećenje aerobnim mezofilnim bakterijama, navodeći kako je to i očekivano, s obzirom na ovakve sustave proizvodnje jer kokoši nesilice provode vrijeme na otvorenom prostoru, jedući insekte i crve te imaju pristup svježem zraku i dnevnom svjetlu (67).

U ovom istraživanju, broj ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija bio je najniži prilikom inkubacije jaja pri 37 °C tijekom razdoblja od 14 dana. Aerobne mezofilne bakterije rastu na umjerenim temperaturama između 20 °C i 45 °C, a optimalna temperatura rasta im je pri sobnoj temperaturi (21 °C) (68). Međutim, bakterije su vrlo prilagodljive i stoga se mogu naći u širokom rasponu staništa. Njihov porast, osim temperature, ovisit će i o prisutnosti hranjivih tvari, sunčeve svjetlosti i relativne vlažnosti okoliša (69). Zanimljivo je da je porast bakterija bio viši pri temperaturi inkubacije od 4 °C u odnosu na 37 °C, koja je bliža njihovom optimumu rasta. Usprikoš manjoj vrijednosti ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija pri 37 °C, skladištenje jaja u takvim uvjetima zacijelo nije prihvatljivo jer je povišena temperatura aktivator razvoja pilećeg embrija (70).

Rezultati ovoga rada pokazali su da u uzorcima domaćih jaja kokoši iz slobodnog uzgoja nisu izolirane patogene bakterije *Salmonella spp.* tijekom 14 dana njihove inkubacije pri 4 °C, 21 °C i 37 °C. Pojedine studije su izvijestile kako jaja iz slobodnog uzgoja često imaju veću bakterijsku kontaminaciju ljuske u odnosu na kavezni uzgoj, ali sličnu ili nižu bakterijsku kontaminaciju od jaja proizvedenih u podnom (stajskom) uzgoju (42). Ferrante i sur. (2009) otkrili su značajno veću kontaminaciju organskim tvarima kod jaja u slobodnom uzgoju u odnosu na stajski uzgoj, što se pripisuje tomu da kokoši iz slobodnog uzgoja nesu jaja na otvorenome prostoru bez propisanih gnijezda za polaganje jaja (71).

Prema izvješću EFSA iz 2007. godine zabilježena je manja prisutnost onečišćenja jaja bakterijom roda *Salmonella spp.* kod jaja u slobodnom uzgoju u odnosu na podni i stajski uzgoj (72). Međutim, u istraživanju Jones i sur. analizirana je prevalencija bakterije *Salmonella spp.* povezanih s jajima iz konvencionalnoga kaveznoga i slobodnog uzgoja. Uzorci jaja prikupljeni su iz konvencionalnoga kaveznoga uzgoja, slobodnog uzgoja sa i bez gnijezda za polaganje jaja. Uzorci su prikupljeni svakih 6 tjedana od kokoši u starosti 20 – 79 tjedana. Prisutnost salmonele analizirala se na površini ljuske jaja, unutrašnjem sadržaju jaja i u okolišu analiziranih sustava proizvodnje. Salmonela je otkrivena u svim uzorcima, a nije postojala značajna razlika ( $p > 0.05$ ) u učestalosti detekcije na površini ljuske i unutrašnjem sadržaju jaja, kao ni u uzorcima okoliša. Salmonela nije otkrivena na površini ljuske jaja iz slobodnog uzgoja koja su sadržavala gnijezda za polaganje. Za razliku od toga, na površini jaja u kaveznom uzgoju salmonela je izolirana samo tijekom zimskoga razdoblja (25%;  $p < 0.05$ ), a u jajima iz slobodnog uzgoja bez gnijezda za polaganje izolirana je tijekom jesenskoga razdoblja (9%) (73). Studija je pokazala da nije bilo značajnih razlika u prevalenciji salmonele između različitih sustava držanja kokoši u analiziranim uzorcima. Iako su kokoši iz slobodnog uzgoja imale pristup otvorenom prostoru i duži kontakt s jajima, prevalencija salmonele nije bila veća, što je slično rezultatima studije De Vylder i sur., koji nisu pronašli naznake da je slobodan uzgoj uzrok povećane kontaminacije jaja salmonelom (73,74).

S površine ljuske jaja iz slobodnog uzgoja nije izoliran niti *Campylobacter spp.* tijekom 14 dana inkubacije jaja pri temperaturi od 4 °C, 21 °C i 37 °C (slika 7). Slični rezultati dobiveni su istraživanjem Sahin i sur., gdje su analizirana jaja iz komercijalne proizvodnje koja su dobavljena od strane različitih proizvođača pri različitim uvjetima uzgoja. Nije bilo poznato jesu li kokoši nesilice u vrijeme sakupljanja jaja bile zaražene kampilobakterom. Analizirano je ukupno 1000 jaja u mjesečnim intervalima (po 100 jaja) i testirano na kampilobakter. Jaja su bila stara <10 dana i podvrgnuta standardnim postupcima čišćenja (pranje i dezinfekcija deterdžentom) koji se redovito koriste u komercijalnim sustavima proizvodnje. Kako bi se utvrdila kontaminacija jaja kampilobakterom, aseptično su odvojeni sadržaj jaja i membrane ljuske, dok se kod 10 uzoraka jaja nije odvajao sadržaj i membrana ljuske, već su objedinjeni kao jedan uzorak. Prisutnost *Campylobacter spp.* analizirana je metodom selektivnog obogaćivanja i PCR metodom detekcije. Ni u jednome dostavljenom uzorku nije otkrivena prisutnost *Campylobacter spp.* (75). Sposobnost kampilobaktera da prodiere kroz ljusku jajeta te vanjsku i unutarnju membranu ljuske jajeta istražena je primjenom procesa diferencijalne temperature koja djeluje na pretpostavci da se toplo

jaje skuplja tijekom hlađenja, rezultirajući negativni tlak pomoću kojega može uvući bakterije kroz ljusku jaja. Sahin i sur. navode kako ovi rezultati ukazuju na to da je prijenos kampilobaktera putem jaja malo vjerojatan zbog njegove ograničene sposobnosti za invazije ljuske jaja i slaboga preživljavanja na površini jaja, zračnoj vrećici i bjelančevinama te da bi se kontrola kampilobaktera trebala usredotočiti na izvore infekcije koji nisu povezani s jajima (76).

Analizirani su uzorci izmeta kokoši te gnijezda za polaganje jaja. Uzeti su uzorci svježeg izmeta kokoši i prebrisane su površine dvaju gnijezda za polaganje jaja - gnijezdo 1 i gnijezdo 2. Uzorci su analizirani unutar 24 sata nakon uzorkovanja, a *Salmonella spp.* i *Campylobacter spp.* nisu izolirani iz navedenih uzorka (slika 8). Mogući razlog tomu izvijestila je studija Shane i sur., gdje je eksperimentalno utvrđeno kako *C. jejuni* u fekalnoj suspenziji ima sposobnost preživljavanja najviše 16 sati, dok je za *C. jejuni* procijenjeno kako ne bi preživio u 50% uzoraka jaja 10 sati nakon onečišćenja. Relativno kratko trajanje vijabilnosti pripisuje se osjetljivosti *C. jejuni* na isušivanje povezano sa sušenjem fekalne suspenzije. Unatoč kampilobakteru odavno je poznato kako *Salmonella spp.* ima sposobnost dugoga preživljavanja pri niskom aktivitetu vode, a i same kulture salmonele mogu se očuvati liofilizirane. Upravo ove karakteristike omogućuju laku izolaciju iz različitih analiziranih uzoraka i površina (75). Brojne su studije do sada izvijestile kako slobodan uzgoj ima manju učestalost onečišćenja u usporedbi s konvencionalnim kaveznim uzgojem (76). Jedna belgijska studija otkrila je da je u 30% uzoraka fekalija prikupljenih iz kaveznog uzgoja izolirana *Salmonella spp.*, dok su samo dva od 148 uzoraka fekalija prikupljenih iz podnog i slobodnog uzgoja bili pozitivni na salmonelu (77). Te je rezultate podržala britanska studija Wales i sur., koji su utvrdili da je učestalost salmonele u uzorcima iz nastambi veća u kaveznom uzgoju (19%) u usporedbi sa slobodnim uzgojem (10%) (78). Također, studija Recio i sur., koja su ispitivala prisutnost *S. Enteritidis* u izmetu i uzorcima prašine s 5310 gospodarstava za proizvodnju jaja diljem Europske unije, otkrila je da sustavi držanja slobodnog uzgoja imaju znatno nižu kontaminaciju salmonelom u odnosu na kavezni uzgoj (72).

U drugome dijelu ovoga istraživanja praćeno je preživljavanje *S. Enteritidis* na površini ljuske jaja iz slobodnog uzgoja. Jaja su inokulirana dozom od  $10^7$  CFU/ljuski jaja, a rast *S. Enteritidis* praćen je u nekoliko vremenskih točaka tijekom 3 tjedna. Uvjeti skladištenja bili su pri temperaturi hladnjaka (4 °C) na kojoj se jaja kao namirnica najčešće skladište i pri sobnoj

temperaturi od 21 °C. Tijekom razdoblja od 21 dan zabilježen je značajan rast ( $p < 0.05$ ) *S. Enteritidis* u svim analiziranim točkama pri temperaturi od 21 °C u odnosu na 4 °C. Pri temperaturi od 4 °C bakterija *S. Enteritidis* pokazala je kontinuiran pad rasta tijekom razdoblja od 3 tjedna. Najveći porast *S. Enteritidis* na površini ljuske zabilježen je unutar prvih 10 dana nakon inokulacije jaja sa *S. Enteritidis*, s najvećim porastom 10. dana u količini od  $\log 4.7$  CFU/ljuski jajeta (slika 9). Analizom unutrašnjeg sadržaja jaja zabilježena je penetracija *S. Enteritidis* 15. 18. i 21. dan (inkubiranih pri 21 °C) na unutrašnjosti ljuske jaja, dok prisutnost u sadržaju bjelanjka i žumanjka nije zabilježena. S druge strane, pri temperaturi od 4 °C tijekom 21 dana nije izolirana *S. Enteritidis* na unutrašnjosti ljuske, kao ni u žumanjku i bjelanjku. Štoviše, iako je niz autora izvijestio o sposobnosti prodiranja salmonela u unutrašnjost jaja (79), do sada postoji relativno malo istraživanja u vezi s preživljavanjem salmonela na površini ljuske jaja (80). S obzirom da je *S. Enteritidis* dokazana samo na unutrašnjosti ljuske neposredno ispod membrane ljuske, ovakav rezultat nije iznenađujuć. Naime, membrana je jedna od primarnih prepreka bakterijskoj invaziji sadržaja jaja, a bjelanjak, osim što smanjuje pokretljivost bakterija, zbog svoje viskoznosti sadrži visoke količine proteina (poput ovoalbumina i ovotransferina) koji imaju antimikrobni učinak. Povećanje pH sadržaja jaja tijekom starenja također predstavlja jedan od ograničavajućih čimbenika bakterijskoj kontaminaciji unutrašnjosti jaja (15,34,36). U istraživanju Lublin i sur. ispitan je utjecaj temperature na preživljavanje *S. Enteritidis* kod stolnih jaja. Površina jaja bila je inokulirana salmonelom u dozi od  $10^5$  CFU/ljuski jaja, a preživljavanje *S. Enteritidis* procijenjeno u je nekoliko vremenskih točaka. Uvjeti skladištenja bili su pri temperaturi od 6 °C i 25 °C. Nakon skladištenja tijekom 2 tjedna na 25 °C, *S. Enteritidis* dokazana je samo na površini jednog od tri analizirana jaja, a broj salmonela iznosio je  $3,6 \times 10^3$  CFU/jaja, dok tijekom razdoblja od 4-8 tjedana nije zabilježen porast *S. Enteritidis*. Na površini ljuske jaja pri 6 °C niti u jednome vremenskome razdoblju nije zabilježen porast *S. Enteritidis*, kao niti nakon postupka obogaćivanja (80). Međutim, studija Messens i sur. izvijestila je da salmonela češće preživljava na nižim temperaturama (nižim 15 - 25 °C) i pri nižoj relativnoj vlažnosti zraka (79). Ove navode je potvrdio je i Radkowski, koji je izvijestio o značajnijem preživljavanju *S. Enteritidis* pri temperaturi od 2 °C u odnosu na 20 °C i 30 °C, navodeći kako je razlog dužeg preživljavanja pri nižoj temperaturi posljedica smanjenja brzine metabolizma koji je uzrokovan nepovoljnim uvjetima na površini jaja (suhoća i kvaliteta ljuske) (80). Međutim, to nije bio slučaj u ovom istraživanju.



Točan mehanizam kontaminacije ljuske jajeta salmonelom još nije potpuno jasan, ali je opće prihvaćeno da se događa tijekom stvaranja jaja transovarijalnim putem. Schoeini i sur. ispitali su mogućnost prodora salmonele prisutne u izmetu. Jaja su bila inokulirana suspenzijom izmeta kokoši u koje je unesena kultura *S. Enteritidis*, a suspenzija je sadržavala  $10^4$  CFU/g izmeta. Na temperaturi od 25 °C zabilježen je rast salmonele u izmetu koji je pružao potrebne hranjive sastojke, a *S. Enteritidis* penetrirala je 3. dan u ljusku jajeta te se mogla izolirati u unutrašnjem sadržaju jaja. Zabilježeno je smanjeno penetriranje pri temperaturi od 4 °C, pri kojoj *S. Enteritidis* nije dokazana u unutrašnjem sadržaju jaja (81).

Rezultati ovoga istraživanja pokazuju jasnu korelaciju između različitih temperatura čuvanja i rasta bakterijskog onečišćenja jaja iz slobodnog uzgoja. Premda bakterije *Salmonella spp.* i *Campylobacter spp.* nisu izolirane s površine jaja, ukupni rizik od salmonele i kampilobaktera, uzimajući u obzir vjerojatni mali broj onečišćenja u prirodi, može se procijeniti kao vrlo nizak.

Rizik od kontaminacije unutrašnjeg sadržaja jaja salmonelom uvelike će ovisiti o broju bakterija, ali i o različitim uvjetima čuvanja jaja. Iako je mala vjerojatnost da će inokulirana jaja sadržavati količine bakterije *Salmonella spp.*, koje su korištene u ovome istraživanju, zaključak je da je kontaminirano jaje potencijalna opasnost u svakoj fazi rukovanja nakon njegova onečišćenja. Premda je niska vjerojatnost da će neko jaje biti kontaminirano, nikako se ne može znati je li salmonela prisutna ili ne te se stoga mjere predostrožnosti moraju dosljedno primjenjivati. Pri rukovanju s kokošjim jajima treba uzeti u obzir rizik izlaganja salmoneli prisutnoj na ljuski jaja, kao i činjenicu da je preživljavanje salmonela potaknuto skladištenjem pri visokim temperaturama.

## 6. ZAKLJUČAK

Na kraju ovoga rada može se iznijeti nekoliko zaključaka:

- Čuvanje jaja pri različitim temperaturama značajno utječe na rast ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija.
- Ukupni broj aerobnih mezofilnih bakterija značajno je viši na površini ljuske kokošnjih jaja prilikom inkubacije na sobnoj temperaturi (21 °C) u odnosu na temperaturu hladnjaka (4 °C).
- *Campylobacter spp.* i *Salmonella spp.* česti su patogeni koji asimptomatski koloniziraju probavni sustav kokoši, a analizom površine ljuske jaja, izmeta i gnijezda za polaganje jaja kokoši iz slobodnog uzgoja nisu izolirani.
- Sposobnost razmnožavanja *S. Enteritidis* na površini ljuske jaja značajno je viša na sobnoj temperaturi (21 °C) u odnosu na temperaturu hladnjaka (4 °C).
- *Salmonella spp.* ima sposobnost kontaminacije ne samo ljuske, već i unutrašnjeg sadržaja jaja.
- Sposobnost penetracije *S. Enteritidis* u unutrašnji sadržaj jaja značajno je viša prilikom inkubacije jaja na sobnoj temperaturi (21 °C) u odnosu na temperaturu hladnjaka (4 °C).

## 7. LITERATURA

1. Elson H, Gleadthorpe A, Vale M, Mansfield U. Housing and husbandry of laying hens: Past, present and future. *Lohmann Inf.* 2011;46(2):16–24.
2. Chang C, Lahti T, Tanaka T, Nickerson M. Egg proteins: fractionation, bioactive peptides and allergenicity. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2018;98(15):5547-5558.
3. Abdel-Aal E, Akhtar H, Chambers J, Zaheer K. Lutein and Zeaxanthin Carotenoids in Eggs. *Egg Innovations and Strategies for Improvements.* 2017;:199-206.
4. Lesnierowski G, Stangierski J. What's new in chicken egg research and technology for human health promotion? - A review. *Trends in Food Science & Technology.* 2018;71:46-51.
5. Zaheer K. An Updated Review on Chicken Eggs: Production, Consumption, Management Aspects and Nutritional Benefits to Human Health. *Food and Nutrition Sciences.* 2015;06(13):1208-1220.
6. CHANG Y. Prevalence of *Salmonella spp.* in Poultry Broilers and Shell Eggs in Korea. *Journal of Food Protection.* 2000;63(5):655-658.
7. Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, Humphrey T et al. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella Enteritidis*. *FEMS Microbiology Reviews.* 2009;33(4):718-738.
8. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal.* 2021;19(2).
9. Sahin O, Kobalka P, Zhang Q. Detection and survival of *Campylobacter* in chicken eggs. *Journal of Applied Microbiology.* 2003;95(5):1070-1079.
10. Hermans D, Van Deun K, Martel A, Van Immerseel F, Messens W, Heyndrickx M et al. Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. *Veterinary Research.* 2011;42(1):82.
11. The Editors of Encyclopaedia Britannica. "Chicken" (Internet). *Encyclopedia Britannica.* 2021.
12. Al-Nasser A, Al-Khalaifa H, Al-Saffar A, Khalil F, Albahouh M, Ragheb G et al. Overview of chicken taxonomy and domestication. *World's Poultry Science Journal.* 2007;63(2):285-300.ž

13. Janječić Z. IZ LITERATURE I PRAKSE: KOKOŠ HRVATICA. MESO: Prvi hrvatski časopis o mesu (Internet). 2007 (pristupljeno 26.05.2021.);IX(6):312-315. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/21257>
14. Šilović B. Proizvodnja jaja kokoši hrvaticice (Diplomski rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet; 2019 (pristupljeno 25.05.2021.) Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:592391>
15. Stadelman W. Chicken Eggs. The Cambridge World History of Food. 2000;:499-508.
16. Chambers J, Zaheer K, Akhtar H, Abdel-Aal E. Chicken Eggs. Egg Innovations and Strategies for Improvements. 2017;:1-9.
17. Wang J, Yue H, Wu S, Zhang H, Qi G. Nutritional modulation of health, egg quality and environmental pollution of the layers. Animal Nutrition. 2017;3(2):91-96.
18. Nys Y, Guyot N. Egg formation and chemistry. Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products. 2011;:83-132.
19. Adegbenjo A, Liu L, Ngadi M. Non-Destructive Assessment of Chicken Egg Fertility. Sensors. 2020;20(19):5546.
20. Wood-Gush DG, Gilbert AB. The rate of egg loss through internal laying. British Poultry Science. 1970;11(2):161–3.
21. Sah N, Mishra B. Regulation of egg formation in the oviduct of laying hen. World's Poultry Science Journal. 2018;74(3):509–22.
22. Zhao JP, Zhang Q, Jiao HC, Wang XJ, Jiang MJ, Luo H, et al. Ovalbumin expression in the oviduct magnum of hens is related to the rate of egg laying and shows distinct stress-type-specific responses. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 2016;100(5):876–83.
23. Jonchère V, Réhault-Godbert S, Hennequet-Antier C, Cabau C, Sibut V, Cogburn LA, et al. Gene expression profiling to identify eggshell proteins involved in physical defense of the chicken egg. BMC Genomics. 2010;11(1):57.
24. Li-Chan EC, Kim H-O. Structure and Chemical Compositions of Eggs. Egg Bioscience and Biotechnology. 2007;:1–95.
25. Larsen DS. The Structure and Properties of Eggs. Encyclopedia of Food Chemistry. 2019;:27–32.

26. Stadelman WJ. EGGS | Structure and Composition. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2003;:2005–9.
27. van der Wagt I, de Jong IC, Mitchell MA, Molenaar R, van den Brand H. A review on yolk sac utilization in poultry. *Poultry Science*. 2020;99(4):2162–75.
28. Jorgensen P, Steen JA, Steen H, Kirschner MW. The mechanism and pattern of yolk consumption provide insight into embryonic nutrition in *Xenopus*. *Development*. 2009;136(9):1539–48.
29. Guilmineau F, Kulozik U. Impact of a thermal treatment on the emulsifying properties of egg yolk. Part 2: Effect of the environmental conditions. *Food Hydrocolloids*. 2006;20(8):1114–23.
30. Anton M. Composition and Structure of Hen Egg Yolk. In: Huopalahti R, López-Fandiño R, Anton M, Schade R, editors. *Bioactive Egg Compounds (Internet)*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007.
31. Guha S, Majumder K, Mine Y, States U, Proteins ES, Proteins EW, et al. *Egg Proteins*. 2018;1–12.
32. Dong X, Zhang YQ. An insight on egg white: From most common functional food to biomaterial application. Vol. 109, *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. 2021. p. 1045–58.
33. Baron F, Nau F, Guérin-Dubiard C, Bonnassie S, Gautier M, Andrews SC, et al. Egg white versus *Salmonella* Enteritidis! A harsh medium meets a resilient pathogen. *Food Microbiology*. 2016;53:82–93.
34. Guyot N, Réhault-Godbert S, Slugocki C, Harichaux G, Labas V, Helloin E, et al. Characterization of egg white antibacterial properties during the first half of incubation: A comparative study between embryonated and unfertilized eggs. *Poultry Science*. 2016;95(12):2956–70.
35. Worsfold P, Townshend A, Poole CF, Miró Manuel. In: *Encyclopedia of Analytical Science*. 3rd Edition. Amsterdam, Netherlands: Elsevier; 2019. p. 375–83.
36. Sharif MK, Saleem M, Javed K. Food Materials Science in Egg Powder Industry. In: *Role of Materials Science in Food Bioengineering*. Elsevier Inc.; 2018. p. 505–37.
37. Wu J, Acero-Lopez A. Ovotransferrin: Structure, bioactivities, and preparation. *Food Res Int*. 2012;46(2):480–7.

38. Lewko L, Krawczyk J, Calik J. Effect of genotype and some shell quality traits on lysozyme content and activity in the albumen of eggs from hens under the biodiversity conservation program. Vol. 100, Poultry Science. Elsevier Inc.; 2021. p. 100(3):100863
39. Silvetti T, Morandi S, Hintersteiner M, Brasca M. Use of Hen Egg White Lysozyme in the Food Industry. In: Egg Innovations and Strategies for Improvements. Elsevier Inc.; 2017. p. 233–42.
40. Duncan IJH. The pros and cons of cages. *Worlds Poult Sci J* . 2001;57(4):386–90.
41. Crnčan A, Kristić J, Hadelan L. KOMPETITIVNA ANALIZA PROIZVODNJE JAJA U STAJSKOM SUSTAVU DRŽANJA. *Agronomski glasnik*. 2016. 78(2-3):115-126.
42. Newberry RC. Commercial Free-Range Egg Production Practices. In: Egg Innovations and Strategies for Improvements. Elsevier Inc.; 2017. p. 89–102.
43. Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. Salmonella nomenclature. Vol. 38, *Journal of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology; 2000 (. p. 2465–7.
44. Pui CF, Wong WC, Chai LC, Robin T, Ponniah J, Hidayah MS, et al. Review Article Salmonella: A foodborne pathogen. *Int Food Res J*. 2011;18:465–73.
45. El-Ghany WAA. Salmonellosis: A food borne zoonotic and public health disease in Egypt. *J Infect Dev Ctries*. 2020;14(07 SE-Reviews).
46. Srikanth C V, Cherayil BJ. Intestinal innate immunity and the pathogenesis of Salmonella enteritis. *Immunol Res*. 2007;37(1):61–78
47. Putturu R, Eevuri T, Ch B, Nelapati K. Salmonella Enteritidis - Food borne pathogen - a review. *Int J Pharm Biol Sci*. 2015 (cited 2021 Jun 15);5(1):86–95.
48. Jajere SM. A review of Salmonella enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and adaptation and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Vet World*. 2019; 12(4):504–21.
49. Ryan KJ, Ray CG, Sherris JC. In: Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases. 4th ed. New York, SAD: McGraw-Hill; 2004. p. 362–4.
50. Ricke SC, Gast RK. SALMONELLA | Salmonella Enteritidis. In: Batt CA, Tortorello MLBT-E of FM (Second E, editors. Oxford: Academic Press); 2014. p. 343–8.

51. Vučković D, Abram M. Kampilobakter – najčešći uzročnik bakterijskog proljeva u ljudi širom svijeta. *Medicina Fluminensis*. 2009 45(4):344-350. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/45854>
52. Silva J, Leite D, Fernandes M, Mena C, Gibbs PA, Teixeira P. *Campylobacter spp.* as a Foodborne Pathogen: A Review. *Front Microbiol (Internet)*. 2011 ;2:200.
53. Lastovica AJ, On SLW, Zhang L. The Family Campylobacteraceae. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F, editors. *The Prokaryotes: Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria (Internet)*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 307–35.
54. Yi J, Anderson EJ. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. In: *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. Elsevier Inc.; 2018. p. 899-902.e3.
55. Igwaran A, Okoh AI. Human campylobacteriosis: A public health concern of global importance. *Heliyon*. 2019 Nov 14;5(11):e02814–e02814.
56. Connerton IF, Connerton PL. Chapter 8 - *Campylobacter* Foodborne Disease. In: Dodd CER, Aldsworth T, Stein RA, Cliver DO, Riemann HPBT-FD (Third E, editors. *Academic Press*; 2017. p. 209–21.
57. Mikulić M, Humski A, Njari B, Stojević D, Jurinović L, Špičić S i sur. Metode izdvajanja i dokazivanja bakterija roda *Campylobacter* – klasične i molekularne metode (I. dio) . *Veterinarska stanica*. 2017;48(4):297-303. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/222557>
58. Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, et al. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*. 2000; 403(6770):665–8.
59. Endtz HP. *Campylobacter* Infections. In: *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*. Elsevier; 2020. p. 507–11
60. Ruiz-Palacios GM, Amieva MR. CHAPTER 163 - *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. In: *Long SSBT-P and P of PID (Third E, editor. Edinburgh: W.B. Saunders; 2008. p. 867–72.*
61. Prukner-Radovčić E, Kurečić Filipović S, Hengl B, Spičić S, Knežević D, Pem Novosel I, et al. Godišnje izvješće o zoonozama u Hrvatskoj za 2015./16. godinu. Osijek, Hrvatska: Hrvatska agencija za hranu (HAH); 2017.

62. Awad WA, Hess C, Hess M. Re-thinking the chicken–*Campylobacter jejuni* interaction: a review. *Avian Pathol.* 2018; 47(4):352–63
63. Molnár A, Hess C, Pál L, Wágner L, Awad WA, Husvéth F, et al. Composition of diet modifies colonization dynamics of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. *J Appl Microbiol.* 2015;118(1):245–54.
64. Shane SM, Gifford DH, Yogasundram K. *Campylobacter jejuni* contamination of eggs. *Vet Res Commun.* 1986;10(1):487–92.
65. Moyle T, Drake K, Gole V, Chousalkar K, Hazel S. Bacterial contamination of eggs and behaviour of poultry flocks in the free range environment. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2016;49:88–94.
66. Park S, Choi S, Kim H, Kim Y, Kim B sam, Beuchat LR, et al. Fate of mesophilic aerobic bacteria and *Salmonella enterica* on the surface of eggs as affected by chicken feces, storage temperature, and relative humidity. *Food Microbiol.* 2015;48:200–5
67. Pesavento G, Calonico C, Runfola M, Lo Nostro A. Free-range and organic farming: Eggshell contamination by mesophilic bacteria and unusual pathogens. *J Appl Poult Res.* 2017;26(4):509–17.
68. Willey, Joanne M., Sherwood, Linda, Woolverton, Christopher J., Prescott, Lansing M. Prescott, Harley, and Klein's microbiology. 7th ed. Boston: McGraw-Hill Higher Education; 2008. str. 132-140
69. Haas D, Kriso A, Fritz T, Galler H, Habib J, Ilieva M, et al. Background concentrations of cultivable, mesophilic bacteria and dust particles in the air in urban, rural and mountain regions. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(24):1–20.
70. French NA. The critical importance of incubation temperature. *Avian Biol Res.* 2009;2(1–2):55–9.
71. Ferrante V, Lolli S, Vezzoli G, Cavalchini LG. Effects of two different rearing systems (organic and barn) on production performance, animal welfare traits and egg quality characteristics in laying hens. *Ital J Anim Sci.* 2009;9(2):165–74.
72. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. (2021). *EFSA Journal*, 19(2).
73. Jones DR, Anderson KE, Guard JY. Prevalence of coliforms, *Salmonella*, *Listeria*, and *Campylobacter* associated with eggs and the environment of conventional cage and free-range egg production. *Poult Sci.* 2012;91(5):1195–202.



74. de Vylder J, van Hoorebeke S, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Dewulf J, et al. Effect of the housing system on shedding and colonization of gut and internal organs of laying hens with *Salmonella* Enteritidis. *Poult Sci.* 2009;88(12):2491–5.
75. Himathongkham S, Nuanualsuwan S, Riemann H. Survival of *Salmonella* enteritidis and *Salmonella* typhimurium in chicken manure at different levels of water activity. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;172(2):159–63.
76. Whiley H, Ross K. *Salmonella* and eggs: From production to plate. *Int J Environ Res Public Health.* 2015;12(3):2543–56.
77. Namata H, Méroc E, Aerts M, Faes C, Abrahantes JC, Imberechts H, et al. *Salmonella* in Belgian laying hens: An identification of risk factors. *Prev Vet Med.* 2008;83(3–4):323–36.
78. Wales A, Breslin M, Carter B, Sayers R, Davies R. A longitudinal study of environmental salmonella contamination in caged and free-range layer flocks. *Avian Pathol.* 2007;36(3):187–97.
79. Messens W, Grijspeerdt K, Herman L. Eggshell penetration by *Salmonella*: A review. *Worlds Poult Sci J.* 2005 Jan;61(1):71–86.
80. Radkowski M. Effect of moisture and temperature on survival of *Salmonella* enteritidis on shell eggs. *Arch fur Geflugelkd.* 2002;66(3):119–23.
81. Schoeni JL, Glass KA, McDermott JL, Wong ACL. Growth and penetration of *Salmonella* enteritidis, *Salmonella* heidelberg and *Salmonella* typhimurium in eggs. *Int J Food Microbiol.* 1995;24(3):385–96.

## 8. POPIS SLIKA

<i>Slika 1. Domaća kokoš .....</i>	<i>3</i>
<i>Slika 2. Prikaz nastanka kokošnjega jajeta .....</i>	<i>7</i>
<i>Slika 3. Anatomska građa kokošnjeg jajeta .....</i>	<i>12</i>
<i>Slika 4. Shematski prikaz određivanja bakterije Salmonella spp. i Campylobacter spp. ....</i>	<i>26</i>
<i>Slika 5. Prikaz kolonija ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija poraslih nakon 5 dana inkubacije pri temperaturi od 4 °C (a), 21°C (b) i 37 °C (c).....</i>	<i>29</i>
<i>Slika 6. Kinetika rasta ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija na površini ljuske jaja pri različitim temperaturama inkubacije (4 °C, 21 °C i 37 °C) tijekom promatranog perioda od 14 dana. ....</i>	<i>30</i>
<i>Slika 7. Negativan porast bakterije Salmonella spp. na XLD agaru (a) i Campylobacter spp. na Karmali agaru (b) nakon inkubacije pri temperaturama 4 °C (a1, b1), 21°C (a2, b2) i 37 °C (a3, b3).....</i>	<i>31</i>
<i>Slika 8. Negativan porast bakterije Salmonella spp. na XLD agaru (a) i Campylobacter spp. na Karmali agaru (b) u izmetu (a1, b1), gnijezdu 1 (a2, b2) i gnijezdu 2 (a3, b3).....</i>	<i>31</i>
<i>Slika 9. Kinetika rasta S. Enteritidis na površini ljuske jaja pri različitim temperaturama inkubacije (4 °C i 21 °C ) tijekom promatranog perioda od 14 dana. ....</i>	<i>32</i>
<i>Slika 10. Prikaz poraslih kolonija S. Enteritidis 5. dan inkubacije pri temperaturama od 4 °C (a) i 21°C (b). ....</i>	<i>33</i>
<i>Slika 11. Prikaz porasta S. Enteritidis u nutrašnjem sadržaju jaja 15. dan nakon inkubacije pri temperaturama 4 °C (a) i 21°C (b). Unutrašnjost ljuske (a1, b1), bjelanjak (a2, b2) i žumanjak (a3, b3). ....</i>	<i>34</i>

## 9. ŽIVOTOPIS

### OSOBNNE INFORMACIJE:

- **Ime i prezime:** Dinko Radojković
- **Spol:** M
- **Datum rođenja:** 04.02.1998 (Đakovo)
- **Adresa:** Stjepana Radića 80, 31422 Tomašanci
- **Državljanstvo:** Hrvat
- **E-mail:** dinko.radojkovic04@gmail.com

### OBRAZOVANJE:

- **2004. - 2008.** Područna škola Tomašanci, Kralja Tomislava 2 Tomašanci, 31422 Gorjani
- **2008. - 2012.** Osnovna škola Gorjani, Bolokan 20, 31422 Gorjani
- **2012. - 2016.** I. Gimnazija Osijek, Županijska 4, 54000 Osijek
- **2016. - 2019.** Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Prediplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva, Ul. Braće Branchetta 20/1, 51000 Rijeka
- **2019. - 2021.** Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Diplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva, Ul. Braće Branchetta 20/1, 51000 Rijeka

### RADNO ISKUSTVO:

- **srpanj 2016. - rujan 2016.** - Servir, grill „Lanterna“, Jadranka d.o.o, Mali lošinj
- **srpanj 2019. - rujan 2019.** - Blagajnik, Tommy d.o.o, Nin Fizički poslovi raznih profila
- **ožujak 2021. - srpanj 2021.** - Epidemiološki poslovi, NZZJZ PGŽ, Krešimirova 52a, 51000 Rijeka

### VJEŠTINE:

- **Materinski jezik:** hrvatski
- **Strani jezici:** engleski, njemački
- **Ostalo:** Rad u programu MS Office