

# Optimiranje komercijalno dostupnih metoda izolacije RNK i detekcija koronavirusa (SARS-COV-2) u lancu hrane

---

**Mlinar, Zdenko**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:128710>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-05**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)





Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu

Zdenko Mlinar

**OPTIMIRANJE KOMERCIJALNO  
DOSTUPNIH METODA IZOLACIJE RNK  
I DETEKCIJA KORONAVIRUSA  
(SARS-CoV-2) U LANCU HRANE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu

Zdenko Mlinar

**OPTIMIRANJE KOMERCIJALNO  
DOSTUPNIH METODA IZOLACIJE RNK  
I DETEKCIJA KORONAVIRUSA  
(SARS-CoV-2) U LANCU HRANE**

DOKTORSKI RAD

Mentorica:

Prof. dr. sc. Jadranka Frece

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Zdenko Mlinar

**OPTIMIZATION OF COMMERCIALY  
AVAILABLE METHODS FOR RNK  
ISOLATION AND DETECTION OF  
CORONAVIRUSES (SARS-COV-2) IN  
THE FOOD CHAIN**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:

PhD Jadranka Frece, Full Professor

Zagreb, 2023.

*Ovaj doktorski rad izrađen je pod mentorstvom prof. dr. sc. Jadranke Frece u Laboratoriju za mikrobiološke analize hrane, Odjela za mikrobiološke analize hrane, predmeta opće upotrebe i okolišnih uzoraka pri Službi za zaštitu okoliša i zdravstvenu ekologiju Nastavnog zavoda za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar u Zagrebu, kojemu je ravnatelj prof. prim. dr. sc. Branko Kolarić, dr. med. Rad je napravljen unutar projekta „Centar za sigurnost i kvalitetu hrane“ (KK.01.1.1.02.0004), a projekt je sufinancirala Europska unija iz Europskog fonda za regionalni razvoj.*

Informacije o mentorici: prof. dr. sc. Jadranka Frece

Prof. dr. sc. Jadranka Frece rođena je u Zagrebu 27. ožujka 1974. godine, a diplomirala je 1997. godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2003. stekla je akademski stupanj magistra biotehničkih znanosti, znanstveno polje biotehnologija. Akademski stupanj doktora biotehničkih znanosti stekla je 2007. godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Sudjeluje u izvođenju predmeta: Mikrobiologija, Mikrobiologija namirnica, Bakteriologija, Mikologija, Mikrobiologija hrane i Mikrobni indikatori u kontroli kvalitete hrane na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Zvanje izvanredne profesorice stječe 24. siječnja 2012. godine, redovite profesorice u travnju 2016., a redovite profesorice u trajnom zvanju 2021. godine. Usavršavala se na Biotehniškoj fakulteti Univerza v Ljubljani, Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu te na Karl-Franzens-Universität u Grazu. Koautorica je pet sveučilišnih udžbenika, jedne znanstvene knjige te devet poglavlja u znanstvenim knjigama i tri poglavlja u udžbenicima, a pod njenim mentorstvom izrađeno je 27 diplomskih radova, 20 završnih radova i obranjena su četiri doktorska rada. Također je pod njenim mentorstvom izrađen jedan magistarski rad i dva magistarska specijalistička rada. Prof. dr. sc. Jadranka Frece bila je članica znanstvenog i organizacijskog odbora mnogih znanstvenih međunarodnih kongresa. Glavna je urednica časopisa *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*. Znanstvena istraživanja vezana su uz područje opće i primijenjene mikrobiologije, mikrobnog kvarenja hrane i antimikrobne aktivnosti prirodnih biokonzervansa u zaštiti hrane. Recentna znanstvena istraživanja obuhvaćaju identifikaciju i karakterizaciju probiotičkih i autohtonih funkcionalnih starter kultura i njihovu proizvodnju za fermentirane proizvode. Rezultati tih istraživanja zaštićeni su u 3 nacionalna patenta. Objavila je ukupno 105 znanstvenih radova te desetak stručnih radova. Dobitnica je Državne nagrade za znanost za 2014. godinu te mnogih drugih nagrada za znanstveni doprinos i inovacije (ARCA 2007. i 2021.). Prof. dr. sc. Jadranka Frece bila je prodekanica za znanstveno-istraživački rad Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu od 2011. – 2015. godine. Ponovno je 2015. godine izabrana za prodekanicu za znanost, a od 2019. – 2023. godine obnašala je dužnost dekanice Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Članica je Hrvatskog društva za biotehnologiju, Hrvatskog društva prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista, Hrvatskog mikrobiološkog društva te član suradnik u Odjelu za bioproceno inženjerstvo Akademije tehničkih znanosti Hrvatske (HATZ).

## **Zahvala**

Najiskrenije se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Jadranki Frece za podršku i motivaciju od samih početaka, dok se još sve činilo kao nestvaran san. Hvala na prilici i nesebičnoj pomoći te uloženom vremenu i trudu tijekom izrade mojeg doktorskog rada.

Zahvaljujem se i dr. sc. Deniju Kostelcu na savjetima, motivaciji, brizi i riječima ohrabrenja.

Veliko hvala dr. sc. Ivančici Kovaček za svu potporu, vjeru i ideje kada bih došao do zida, kao i za priliku koju mi je pružila te omogućila da eksperimentalni dio doktorskog rada izradim na Odjelu za mikrobiološke analize hrane, predmeta opće uporabe i okolišne uzorke.

Zahvaljujem se kolegama iz Odjela za dezinfekciju, dezinsekciju i deratizaciju Službe za epidemiologiju, a posebno dr. sc. Ani Klobučar na ustrajnom prikupljanju uzoraka i stalnoj podršci.

Zahvaljujem se i ostalim kolegama na pripremi i provedbi eksperimenata, sakupljanju i dostavi uzoraka koje sam koristio u eksperimentalnom dijelu rada, a posebice kolegi i prijatelju Vedranu Prahinu.

Najveće hvala, od srca, mojoj supruzi na bezuvjetnoj potpori, moralnoj podršci i strpljenju, kao i neiscrpnj vjeri u mene sve ovo vrijeme. Hvala mojim roditeljima i sestri koji su me kroz život usmjeravali, podržavali i vjerovali u mene.

Stoga, ovaj rad posvećujem svojoj obitelji.

Hvala vam svima!

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Poslijediplomski sveučilišni studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo

UDK: 577.216:578.834:591.133.1(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

### OPTIMIRANJE KOMERCIJALNO DOSTUPNIH METODA IZOLACIJE RNK I DETEKCIJA KORONAVIRUSA (SARS-COV-2) u lancu hrane

Zdenko Mlinar, univ. spec. techn. aliment.

Rad je izrađen u Laboratoriju za mikrobiološke analize hrane, NZJZ „Dr. Andrija Štampar“ u Zagrebu.

**Mentor:** prof. dr. sc. Jadranka Frece

#### **Kratki sažetak**

Novi koronavirus SARS-CoV-2 primarno je respiratorni virus, no putevi prijenosa nisu u potpunosti razjašnjeni pa tako niti onaj kroz lanac hrane. Tehnika izolacije ribonukleinskih kiselina (RNK) jedan je od najvažnijih elemenata u otkrivanju SARS-CoV-2. U ovom radu napravljeno je eksperimentalno ispitivanje i procjena četiri najprikladnija komercijalno dostupna izolacijska kita s izvornim protokolom proizvođača i modificiranim protokolom u koraku precipitacije u kojem se koristio etanol, odnosno izopropanol. Na osnovu tih rezultata izdvojen je najprikladniji kit kojim je napravljena izolacija RNK iz uzoraka briseva površina pakiranja hrane, površine hrane i gotovih jela, a zatim i detekcija virusa putem RT-PCR-a u stvarnom vremenu. Dobiveni rezultati dali su uvid u stvarno stanje prisutnosti virusa SARS-CoV-2 u lancu hrane te uz pregled dostupne literature omogućili pojašnjavaње uloge i značaja hrane kao mogućeg vektora za prijenos virusa SARS-CoV-2. Uz ispitivanje prisutnosti virusa, u svim uzorcima ispitana je bakterijska flora, u brisevima indikatorski mikroorganizmi, a u hrani mikroorganizmi prema kriterijima nacionalnog Vodiča za mikrobiološke kriterije. Posebno su znakoviti rezultati potvrde primjenjivosti odabranog kita koji ukazuju na značajan udio uzoraka površina pozitivnih na virus SARS-CoV-2 s naglaskom da su ti uzorci iz prostora u kojima su boravile oboljele osobe s manje izraženim simptomima ili bez simptoma. Prema rezultatima zaključnog dijela studije u kojoj su ispitani uzorci koji se odnose na lanac hrane, može se zaključiti da je mogućnost infekcije neznatna s obzirom na to da virus i virusne čestice u tim uzorcima nisu otkriveni.

**Broj stranica:** 104

**Broj slika:** 8

**Broj tablica:** 17

**Broj literaturnih navoda:** 136

**Jezik izvornika:** hrvatski

Ključne riječi: SARS-CoV-2; hrana; RT-PCR; koronavirus; prijenos hranom; izolacija RNK

**Datum obrane:** xx.xx.2023.

#### **Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof. dr. sc. Ksenija Markov
2. Prof. dr. sc. Jasna Novak
3. Prof. dr. sc. Jasna Bošnjir
4. Prof. dr. sc. Jasna Mrvčić (zamjenski član)

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice 4 i u Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14.



## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

PhD thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Postgraduate University Doctoral Study in Biotechnology and Bioprocess Engineering

UDK: 577.216:578.834:591.133.1(043.3)

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Biotechnology

### Optimization of commercially available methods for RNA isolation and detection of coronaviruses (SARS-CoV-2) in the food chain

Zdenko Mlinar, univ. spec. techn. aliment.

Thesis performed in Laboratory for food microbiology, NZJZ "Dr. Andrija Štampar" in Zagreb

**Supervisor:** PhD Jadranka Frece, Full Professor

#### Short abstract

The new coronavirus SARS-CoV-2 is primarily a respiratory virus, but the routes of transmission have not been fully clarified, including the one through the food chain. The ribonucleic acid (RNA) isolation technique is one of the most important elements in the detection of the SARS-CoV-2. In this paper, experimental testing and evaluation of the four commercially available extraction kits with the original protocol of the manufacturer and a modified protocol in the precipitation step in which ethanol and isopropanol were used were made. The selected kit was used to isolate RNA from swab samples of food packaging surfaces, food surfaces and ready-to-eat meals, followed by virus detection via real-time RT-PCR. The obtained results gave an insight into the actual situation of the presence of the SARS-CoV-2 virus in the food chain, and with a review of the available literature, made it possible to clarify the role and significance of food as a possible vector for the transmission of the SARS-CoV-2 virus. In addition to testing the presence of viruses, all samples were tested for bacterial flora, indicator microorganisms in swabs, and in food for microorganisms according to the criteria of the national Guide for microbiological criteria. The results of the confirmation of the applicability of the selected kit are particularly significant, indicating a significant proportion of surface samples positive for the SARS-CoV-2 virus, with the emphasis that these samples are from areas where sick persons with less pronounced symptoms or no symptoms have stayed. According to the results of the final part of the study in which the samples related to the food chain were examined, it can be concluded that the possibility of infection is trivial since the virus and virus particles were not detected in these samples.

**Number of pages:** 104

**Numer of figures:** 8

**Number of tables:** 17

**Number of references:** 136

**Original in:** Croatian

**Keywords:** SARS-CoV-2; food; RT-PCR; coronavirus; foodborne transmission; RNA extraction

**Date of thesis defence:** xx.xx.2023.

#### Reviewers:

1. PhD. Ksenija Markov, Full professor
2. PhD. Jasna Novak, Full professor
3. PhD. Jasna Bošnjir, Senior Research Scientist
4. PhD. Jasna Mrvčić, Full professor (substitute)

**Thesis is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, and in the University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14.

Tema doktorskog rada prihvaćena je na 2. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta za akademsku godinu 2021./2022. održanoj dana 24. studenog 2021. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija na sjednici održanoj 12. travnja 2022. godine.

## Sažetak

Novi koronavirus SARS-CoV-2 doveo je do pojave bolesti COVID-19 i uzrokovao preko 6 milijuna smrtnih slučajeva, odnosno jednu od najsmrtonosnijih pandemija u povijesti. Iako je jasno da je SARS CoV-2 primarno respiratorni virus, nisu u potpunosti razjašnjeni putevi prijenosa. Postoje pretpostavke za prijenos kontaktom preko fomita (neživi kontaminirani predmeti putem kojih se može prenijeti bolest) i kroz tkivo sluznice, što usnu šupljinu postavlja kao potencijalno važno mjesto za infekciju, dok prijenos hranom još uvijek nije razjašnjen. Jedan od razloga te činjenice leži u tome što ne postoji standardizirani pristup uzorkovanju i obradi te dijagnosticiranju virusa u uzorcima iz okoliša, a posebno u hrani u širem smislu riječi. Iako postoji nekoliko pojedinačnih studija još uvijek nema dovoljno istraživanja koja bi objasnila stvarnu ulogu hrane u prijenosu virusa. Stoga, ciljevi ovog rada bili su ispitati i predstaviti procjenu najprikladnijeg kita za izolaciju ribonukleinskih kiselina (RNK) iz uzoraka okoliša, odnosno hrane, od ukupno četiri odabrana komercijalno dostupna kita, kako bi se izdvojio najučinkovitiji. S odabranim kitom uspostavio se optimalan izolacijski protokol kao rješenje za primjenu u daljnjem istraživanju, odnosno izolaciji RNK iz uzoraka briseva površina pakiranja hrane, površina hrane i hrane spremne za konzumaciju, odnosno toplih i hladnih gotovih jela, a zatim i otkrivanju virusa SARS-CoV-2 u navedenim uzorcima. Nakon provedenog istraživanja kroz dobivene rezultate dobio bi se jasan uvid u prisutnost ciljanog virusa u okolišu, u smislu hrane, iz čega bi se mogla vidjeti mogućnost infekcije kontaktom ili izravnom konzumacijom hrane. Pronalaženje najbolje tehnike za izolaciju RNK ključan je korak i jedan od najvažnijih elemenata u otkrivanju genoma SARS-CoV-2. To je postignuto eksperimentom na četiri komercijalna kita s izvornim protokolom proizvođača i modificiranim protokolom u koraku precipitacije u kojem se koristio etanol, odnosno izopropanol. Studija i dobiveni rezultati istraživanja omogućili su da se identificira i utvrdi najučinkovitiji kit, odnosno protokol za izolaciju RNK iz uzoraka. Izdvojeni kit dvostruko je potvrđen kroz ispitivanje primjenjivosti, nakon čega je korišten u sljedećem dijelu istraživanja.

Odabranim kitom napravljena je izolacija RNK iz uzoraka briseva i hrane spremne za konzumaciju, a za dokazivanje prisutnosti koronavirusa i SARS-CoV-2 virusa ili virusnih čestica u lancu hrane koristila se metoda lančane reakcije polimerazom s reverznom transkripcijom u stvarnom vremenu (real-time reverse transcription polymerase chain reaction; real-time RT-PCR). Krajnji cilj ove disertacije je kroz dobivene rezultate i pregled literature razjasniti mogućnost da površine hrane i konzumacije hrane mogu biti vektor za prijenos virusa te vjerojatnost da se takva situacija dogodi. Uz ispitivanje prisutnosti koronavirusa (SARS-

CoV-2) u svim uzorcima ispitana je prisutna mikrobiološka flora. Uzorci briseva ispitani su u smislu šire skupine indikatorskih mikroorganizama (ukupan broj mikroorganizama, *Bacillus cereus/Bacillus* spp., *Enterobacteriaceae*, koagulaza-pozitivni stafilocoki i plijesni), a uzorci hrane su ispitani i ocijenjeni prema preporučenim kriterijima Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu (3. izmijenjeno izdanje). Rezultati utvrđivanja mikrobiološke populacije u ispitanim uzorcima trebali su poslužiti za provjeru i utvrđivanje moguće korelacije dobivenih rezultata.

Ispitivanjem primjenjivosti kita dobiveni su rezultati koji ukazuju na značajan udio pozitivnih uzoraka na prisutnost virusa SARS-CoV-2 na površinama koje su bile izložene virusu. U svrhu ispitivanja uzorkovane su površine i predmeti u uvjetima koji su osiguravali prisutnost virusa, točnije u karanteni u kojoj su boravile osobe s blagim simptomima ili bez izraženih simptoma bolesti COVID-19. Međutim, prema rezultatima zaključnog dijela studije gdje je naglasak bio na ispitivanju prisutnosti virusa na uzorcima koji se primarno odnose na lanac hrane, točnije površinu ambalaže hrane, površine hrane te samu hranu u smislu gotove hrane spremne za konzumaciju, virus u tim uzorcima nije nađen.

## **Abstract**

The new coronavirus SARS-CoV-2 led to the emergence of the disease COVID-19, which caused over 6 million deaths, making it one of the deadliest pandemics in history. Although it is clear that SARS-CoV-2 is primarily a respiratory virus, its transmission routes have not been fully elucidated. Given that contact transmission via fomites (inanimate contaminated objects through which the disease can be transmitted) and mucosal tissue are suspected, placing the oral cavity as a potentially important site for infection, foodborne transmission is still unclear. One of the reasons for this fact lies in the fact that there is no standardized approach to sampling, processing, and diagnosing viruses in environmental samples, especially in food in the broadest sense of the word. Although there have been several individual studies, there is still not enough research to explain the actual role of food in virus transmission. Therefore, the objectives of this study were to examine and present an assessment of the most suitable kit for the isolation of ribonucleic acids (RNA) from environmental or food samples, out of a total of four commercially available kits, to identify the most efficient kit. Using the selected kit, an optimal isolation protocol was established as a solution for the application of the kit in further research, that is, isolation of RNA from swab samples of food packaging surfaces, food surfaces, and ready-to-eat food, that is, hot and cold ready meals, followed by detection of the SARS-CoV-2 virus in the mentioned samples. The results of this study provide a clear insight into the presence of the target virus in the environment in terms of food, from which the possibility of infection through contact or direct consumption of food could be seen. Identifying the best technique for RNA isolation is a crucial step and one of the most important elements in detecting and identifying the SARS-CoV-2 genome. This was achieved by experimenting with four commercial kits according to the manufacturer's original protocol and a modified protocol in the precipitation step in which ethanol and isopropanol were used. The study and the obtained research results made it possible to identify and determine the most effective kit and protocol for isolating RNA from samples. In further work, the most effective kit was double-confirmed in the applicability confirmation phase, after which the kit was used in the next part of the study. The selected kit was used to isolate RNA from swab samples and ready-to-eat food, and the polymerase chain reaction method with reverse transcription in real-time (real-time RT-PCR) was used to detect the presence of the coronavirus and SARS-CoV-2 or viral particles in the food chain. The final goal of this dissertation is to clarify the possibility that food surfaces or food consumption can be a vector for SARS-CoV-2 transmission and the probability of such a situation occurring through the obtained results and a review of the relevant literature. In

addition to testing for the presence of the coronavirus (SARS-CoV-2), all samples were tested for the presence of microbiological flora. Swab samples were examined for a wider group of indicator microorganisms (total number of microorganisms, *Bacillus cereus/Bacillus* spp., *Enterobacteriaceae*, coagulase-positive staphylococci, and molds), and food samples were examined and evaluated according to the recommendations of the Guide to Microbiological Criteria for Food (3. amended edition). The results of determining the microbiological population in the tested samples should be used to verify and determine the possible correlation between the obtained results. By testing the applicability of the kit, the results showed a significant proportion of positive samples for SARS-CoV-2 on surfaces that were exposed to the virus. However, according to the results of the final part of the study, the emphasis was on examining the presence of viruses in samples that primarily relate to the food chain, specifically the surface of food packaging, the surface of food, and the food itself in terms of ready-to-eat food, the virus was not found in these samples.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO .....	4
2.1 Koronavirusi .....	6
2.1.1 Klasifikacija koronavirusa.....	6
2.1.2 Koronavirusi s epidemiološkim značajem za ljude u odnosu s novootkrivenim virusom SARS-CoV-2 .....	8
2.2 Mogućnosti širenja koronavirusa SARS-CoV-2 putem hrane .....	10
2.3 Izolacija i detekcija virusa SARS-CoV-2.....	12
3. MATERIJALI I METODE .....	14
3.1 Materijali .....	14
3.1.1 Uzorci .....	14
3.1.2 Kitovi za izolaciju RNK.....	15
3.1.3 Kitovi za detekciju koronavirusa/SARS-CoV-2/MNV .....	15
3.1.4 Hranjive podloge i diluenti.....	15
3.1.5 Uređaji.....	20
3.1.6 Pribor.....	21
3.1.7 Kemikalije i reagensi.....	21
3.1.8 Sastav i priprema reagensa i pufera.....	22
3.2 Metode .....	23
3.2.1 Protokoli za izolaciju nukleinskih kiselina.....	23
3.2.1.1 Absolutely RNA Miniprep kit za izolaciju nukleinskih kiselina .....	23
3.2.1.1.1 Priprema reagensa DNaza I bez RNaze .....	24
3.2.1.1.2 Priprema pufera za ispiranje s visokim udjelom soli .....	24
3.2.1.1.3 Priprema pufera za ispiranje s niskim udjelom soli .....	24
3.2.1.1.4 Priprema 70 % etanola .....	24
3.2.1.1.5 β-Merkaptoetanol (β-ME) .....	25
3.2.1.1.6 Protokol za izolaciju RNK .....	25
3.2.1.2 RealLine Extraction 100 kit za izolaciju nukleinskih kiselina.....	26
3.2.1.2.1 Priprema pufera za liziranje .....	27
3.2.1.2.2 Priprema mješavine pufera za liziranje i suspenzije magnetskih čestica.	27
3.2.1.2.3 Protokol za izolaciju RNK .....	27
3.2.1.3 VIRSeek RNAExtractor kit za izolaciju nukleinskih kiselina .....	28
3.2.1.3.1 Priprema pufera za ispiranje WB1 .....	28
3.2.1.3.2 Priprema pufera za ispiranje WB2 .....	28

3.2.1.3.3	Priprema pufera za ispiranje WB3 .....	29
3.2.1.3.4	Otopina nosača (eng. carrier) RNK .....	29
3.2.1.3.5	Dodavanje nosača RNK u pufer za liziranje .....	29
3.2.1.3.6	Protokol za izolaciju RNK .....	29
3.2.1.4	QIAamp Viral RNA Mini kit za izolaciju nukleinskih kiselina .....	31
3.2.1.4.1	Priprema AVE pufera .....	32
3.2.1.4.2	Priprema mješavine otopljenih nosača RNK i AVL pufera.....	32
3.2.1.4.3	Priprema AW1 pufera .....	33
3.2.1.4.4	Priprema AW2 pufera .....	33
3.2.1.4.5	Protokol za izolaciju RNK .....	34
3.2.1.5	Protokol za pripremu uzoraka hrane .....	35
3.2.1.5.1	Protokol za pripremu uzoraka hrane i naknadnu izolaciju RNK .....	35
3.2.2	Modifikacija protokola na temelju upotrebe etanola/izopropanola.....	36
3.2.3	Procjena najučinkovitijeg izolacijskog kita za provedbu ispitivanja .....	37
3.2.4	Potvrda primjenjivosti odabranog kita .....	39
3.2.5	Odabir i uzorkovanje uzoraka .....	40
3.2.6	Izolacija RNK iz izuzetih uzoraka .....	41
3.2.7	Lančana reakcija polimeraze s reverznom transkripcijom u stvarnom vremenu (RT-PCR).....	41
3.2.8	Mikrobiološke metode.....	43
3.2.8.1	Određivanje ukupnog broja mikroorganizama .....	45
3.2.8.2	Dokazivanje prisutnosti <i>Salmonella</i> spp.....	45
3.2.8.3	Određivanje broja koagulaza-pozitivnih stafilokoka .....	46
3.2.8.4	Određivanje broja <i>Bacillus cereus</i> .....	46
3.2.8.5	Dokazivanje prisutnosti <i>Listeria monocytogenes/Listeria</i> spp. ....	47
3.2.8.6	Određivanje broja sulfitreducirajućih klostridija .....	48
3.2.8.7	Određivanje broja plijesni.....	48
3.2.8.8	Određivanje broja <i>Enterobacteriaceae</i> .....	49
3.2.8.9	Izračunavanje i izražavanje rezultata mikrobioloških ispitivanja.....	50
3.2.9	Statistička interpretacija podataka.....	51
4.	REZULTATI.....	53
4.1	Procjena radnih karakteristika odabranih kitova za izolaciju RNK .....	53
4.2	Potvrda prikladnosti i primjenjivosti izdvojenog kita .....	57
4.3	Ispitivanje prisutnosti virusa na površinama pakiranja hrane, površinama hrane i gotovim jelima.....	62



4.3.1	Rezultati ispitivanja prisutnosti virusa na površinama pakiranja hrane i površinama hrane .....	63
4.3.2	Rezultati ispitivanja prisutnosti virusa u gotovim jelima.....	66
4.4	Ispitivanje prisutne mikrobiološke populacije na površinama pakiranja hrane, površinama hrane i gotovim jelima .....	68
4.4.1	Rezultati ispitivanja prisutne mikrobiološke populacije na površinama pakiranja hrane i površinama hrane .....	68
4.4.2	Rezultati ispitivanja prisutne mikrobiološke populacije u uzorcima gotovih jela 71	
5.	RASPRAVA .....	74
5.1	Karakteristike odabranih kitova za izolaciju RNK i određivanje optimalnog protokola za provedbu ispitivanja.....	76
5.2	Prikladnost i primjenjivost izdvojenog kita.....	79
5.3	Prisutnost virusa na površinama pakiranja hrane, površinama hrane i gotovim jelima 81	
6.	ZAKLJUČCI.....	88
7.	LITERATURA .....	89

## 1. UVOD

Dana 11. ožujka 2020. Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) proglasila je pandemiju uzrokovanu novim koronavirusom SARS-CoV-2 (engl. Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2) i pojavu koronavirusne bolesti - COVID-19. Činjenica je da se radi o patogenu koji je uzdrmao svjetsku ekonomiju, a gotovo sve zdravstvene sustave doveo do ruba, ostavljajući iza sebe milijune smrtnih slučajeva (Dong i sur., 2020; JHU/CSSE, 2023). Navedeno govori o nužnosti učenja i razumijevanja mehanizma djelovanja virusa, kao i dinamike i načina širenja. Dok SZO ističe kako se virus može širiti iz usta i nosa malim česticama tekućine (WHO, 2022a), tijekom epidemije SARS-a zabilježen je izravan kontakt preko površina i fekalni prijenos (Harrison i sur., 2020). SZO ističe da je virus SARS-CoV-2 stabilan na +4 °C, baš kao i SARS-CoV i MERS koronavirusi te se očekuje da će se ponašati slično kao i njegovi prethodnici. Također, opsežne studije potvrđuju i jasno pokazuju stabilnost postojanosti SARS-CoV-2 i drugih koronavirusa u okolišu, u ovisnosti o različitim površinama i utjecaju klimatskih uvjeta (Aboubakr i sur., 2021; Chan i sur., 2020; Chin i sur., 2020). Nekoliko radova i preliminarnih studija posebno se usredotočilo na važnost izolacije i praćenja pojave virusa u hrani, ali i na stabilnost virusa na površini hrane (Han i sur., 2021; Aboubakr i sur., 2021; Eslami i Jalili, 2020; Rabenau i sur., 2004; Yépez-Gómez i sur., 2013; SCDC, 2020). Iako složeni, načini prijenosa nisu u potpunosti shvaćeni. Postoje naznake da bi kontaminacija tržnice plodovima mora u Wuhanu u Kini mogla biti izvor izbijanja COVID-19 (Yekta i sur., 2021). Važno je naglasiti kako ne postoje dokumenti koji jasno definiraju prijenos putem hrane ili materijala za pakiranje, ali sposobnost virusa da ostane zarazan na tim matricama upozorava na oprez (Yekta i sur., 2021). S obzirom na to kako SARS-CoV-2 virus ima mogućnost preživljavanja u iznimno širokom pH rasponu (3 – 10), jasno je kako je njegovo preživljavanje moguće i u većini prehrambenih proizvoda (Yekta i sur., 2021). Hrana kao jedan od mogućih vektora prijenosa virusa SARS-CoV-2 predstavljena je i u studiji Huang i sur. (2021). Riječ je o vrlo iscrpnoj i detaljnoj studiji koja pokazuje da je usna šupljina važno mjesto za infekciju SARS-CoV-2 i ukazuje da je slina potencijalni put prijenosa SARS-CoV-2. Dostupna literatura sugerira provođenje više ispitivanja kako bi se bolje razumjeli načini prijenosa, posebice uloga hrane koja ima potencijal djelovati kao prijenosnik spomenutog virusa (Yekta i sur., 2021). Nekoliko studija također ističe da neizravan prijenos iz okruženja, osim bolnica, treba ozbiljno razmotriti uzimajući u obzir postojanost SARS-CoV-2 na različitim površinama, kao i relativno nisku infektivnu dozu i učestalost bolesti kod ljudi (Duda-Chodak i sur., 2020; Warnes i sur.,

2015; Yekta i sur., 2021). Jedno terensko istraživanje u maloprodajnom lancu hrane pokazalo je da je rizik od izloženosti SARS-CoV-2 nizak ako se primjenjuju preventivne mjere zajedno s protokolima za dezinfekciju (Singh i sur., 2021). Konkretno naglasak bio je na provođenju i provedbi mjera socijalnog distanciranja u maloprodajnim trgovinama, provedbi redovitih rutinskih dezinfekcija prostora, korištenju osobne zaštitne opreme (OZO) i sustavnom praćenju zdravlja osoblja u trgovini, odnosno pojačano se pazilo da djelatnici koji imaju bilo kakve simptome bolesti ostanu kod kuće i da ne borave u prostorima trgovine. Korištenje OZO moglo bi se smatrati ključnim za sprječavanje virusa da različitim putevima od asimptomatskih ili presimptomatskih nositelja dospije na površine i tako ih kontaminira. Protokoli čišćenja, sanitacije i dezinfekcije najvjerojatnije su glavni uzrok inaktivacije virusa s obzirom na visoku osjetljivosti virusa na aktivne sastojke sredstava za dezinfekciju. Na iste mjere upućuje i SZO kroz objavljene smjernice namijenjene subjektima u poslovanju hranom (SPH) (WHO, 2022a). Većina istraživanja od početka pandemije bila je usmjerena na obradu kliničkih uzoraka za otkrivanje virusa koji je primarni uzročnik bolesti COVID-19. Većinu metoda, kitova i opreme razvijalo se i optimiralo za obradu te vrste uzoraka kako bi bilo moguće dobiti čim brže rezultate u što manje vremena i što je moguće preciznije uz povećanje osjetljivosti metoda. Stoga, važno je napomenuti da u vrijeme pripreme i provedbe ovih eksperimenata nije postojao nikakav standardizirani protokol ili metodologija za otkrivanje SARS-CoV-2 u uzorcima iz okoliša. Nakon što se krenulo s planiranjem i razradom dostupnih metoda, a zatim i prvim uzorkovanjima te obradom uzoraka, u literaturi su se počeli pojavljivati i prvi protokoli prilagođeni obradi okolišnih uzoraka. S obzirom na tu činjenicu koristile su se preporuke Corman i sur. (2020) koji ističu da bi se ispitivanje uzoraka idealno trebalo provoditi u dva koraka, odnosno kako bi se trebala dokazati prisutnost najmanje dvije genske sekvence što i SZO navodi u svom Vodiču „Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance“ (WHO, 2020b).

Na temelju navedenog, jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je usporednim testovima ispitati i dati procjenu najprikladnijeg i najučinkovitijeg od četiri odabrana komercijalna kita za izolaciju RNK iz okolišnih uzoraka, odnosno uzoraka briseva i gotovih jela spremnih za konzumaciju. Nakon provedene procjene i probira kitova dodatno je ispitana primjenjivost i prikladnost odabranog izolacijskog kita, čime se osiguralo najučinkovitije rješenje za daljnje ispitivanje i otkrivanje SARS-CoV-2. Ispitivanje prisutnosti SARS-CoV-2 planirano je na širokom spektru proizvoda vezanih za lanac hrane, odnosno putem briseva površina pakiranja hrane, površina hrane i gotovih jela spremnih za konzumaciju (toplih i hladnih gotovih jela), dostupnih na hrvatskom maloprodajnom tržištu tijekom pandemije. Dobiveni rezultati

ispitivanja izuzetih uzoraka trebali bi dati jasan uvid u stvarno stanje prisutnosti virusa SARS-CoV-2 te ukazati na mogućnost zaraze kontaktom ili izravnom konzumacijom kontaminirane hrane.

## 2. OPĆI DIO

Postoji veliki broj bolesti uzrokovanih hranom, od onih gdje su uzročnici bakterije i njihovi toksini do onih povezanih s virusnim infekcijama. Najčešći uzročnici virusnih infekcija koji se prenose hranom su virus hepatitisa A (HAV), virus hepatitisa E (HEV) i norovirus (NoV), enterovirus (EV), ljudski rotavirus (RV), astrovirus, Aichi virus, sapovirus, koronavirus, parvovirus i ljudski adenovirus (Petrović i D'Agostino, 2016). Uz razvoj modernih društava i stvaranjem sve većih urbanih kolektiva javlja se i potreba za kvalitetnom i sigurnom hranom, vodom i zrakom. Sve troje navedeno esencijalno je za zdrav i kvalitetan život ljudi, a nikada nije bilo izazovnije navedeno i osigurati. Bez obzira na brz i značajan razvoj svih grana prehrambene industrije, rizici pri osiguravanju zdravstveno ispravne hrane i vode, unatoč suvremenim tehnologijama, još uvijek ostaju stvarna prijetnja i izazov. Štoviše, uz razvoj sve osjetljivijih metoda postajemo svjesni još većeg broja kontaminanata, patogena i njihovih produkata koji se nalaze u okolišu ili su nusprodukti industrijske proizvodnje, a svoj štetan utjecaj na zdravlje imaju upravo preko hrane i vode. Rutinska sustavna (monitoring) mikrobiološka kontrola hrane i vode godinama se svodi na ispitivanje bakterijskih patogena, i to u užem smislu, dok se uzročnicima virusnih bolesti ne daje dovoljno pozornost. Jedan od boljih pregleda najznačajnijih predstavnika iz grupe virusnih patogena koji se prenose hranom i vodom te njihove karakteristike sumirali su Hrđy i Vasickova (2022), a rezultati su prikazani u tablici 1.

Tablica 1. Glavni predstavnici virusa koji se prenose hranom i vodom i njihove karakteristike (Hrdy i Vasickova, 2022)

Genom	Obitelj	Virusi	Klinički simptomi	Infektivna doza
dsDNA	Adenoviridae	adenovirus 40 i 41	povraćanje, proljev	–
ssDNA	Parvoviridae	parvovirus B19	povraćanje, proljev	–
	Polyomaviridae	JC polyomavirus	neurološki simptomi	$\geq 1 \times 10^0$ , TCID <sub>50</sub> , 2 pfp
dsRNA	Reoviridae	rotavirus A G3 i G9	povraćanje, proljev	<100 čestica ili <1 ffu
+ssRNA	Astroviridae	human astrovirus 1	povraćanje, proljev	–
	Caliciviridae	norovirus (Norwalk), sapovirus	povraćanje, proljev	1 – 100 čestica, 18 HID <sub>50</sub>
	Coronaviridae	human torovirus, SARS-CoVb, SARS-CoV-2b*	povraćanje, proljev, bolest dišnog sustava	–
	Flaviviridae	virus krpeljnog encefalitisa	bolest slična gripi, osip	–
	<i>Hepeviridae</i>	hepatitis E virus	hepatitis	–
	Picornaviridae	enterovirus A 71, hepatitis A virus, antavirus A	hepatitis, proljev, osip, neurološki simptomi	10 - 100 čestica, 0,1 g stolice za HAV
-ssRNA	Orthomyxoviridae	virus influenze	bolest slična gripi, proljev	0.6–3 TCID <sub>50</sub>
	Paramyxoviridae	virus Nipah	bolest slična gripi, neurološki simptomi	–

Kratice: ffu: engl. focus forming units; TCID<sub>50</sub>: 50 % infektivna doza kulture tkiva (engl. tissue culture infective dose); HID<sub>50</sub>: 50 % doza zarazna za ljude (engl. human infectious dose); pfp: čestice koje stvaraju plak (engl. plaque forming particles); \*: mogućnosti infekcije putem hrane i vode još uvijek pod revizijom; –: podaci nedostupni/nepoznati

Zadnjih nekoliko godina sve više pitanja se postavlja u smjeru virusnih patogena te ih se često ističe kao važne uzročnike infekcija povezanih s potencijalno kontaminiranom hranom i vodom (Hiscott i sur., 2020; Rajapaksha i sur., 2019; Hrdy i Vasickova, 2022; Han i sur., 2021). U zajedničkom znanstvenom izvješću Organizacije za prehranu i poljoprivredu pri Ujedinjenim narodima i SZO su još 2008. godine istaknuli pojedine kombinacije virusa i hrane te ih okarakterizirali kao prioritet u sprječavanju pojavnosti bolesti. Posebno su istaknuti norovirus (NoV) i virus hepatitisa A (HAV) u školjkama, svježim/sirovim proizvodima koji su

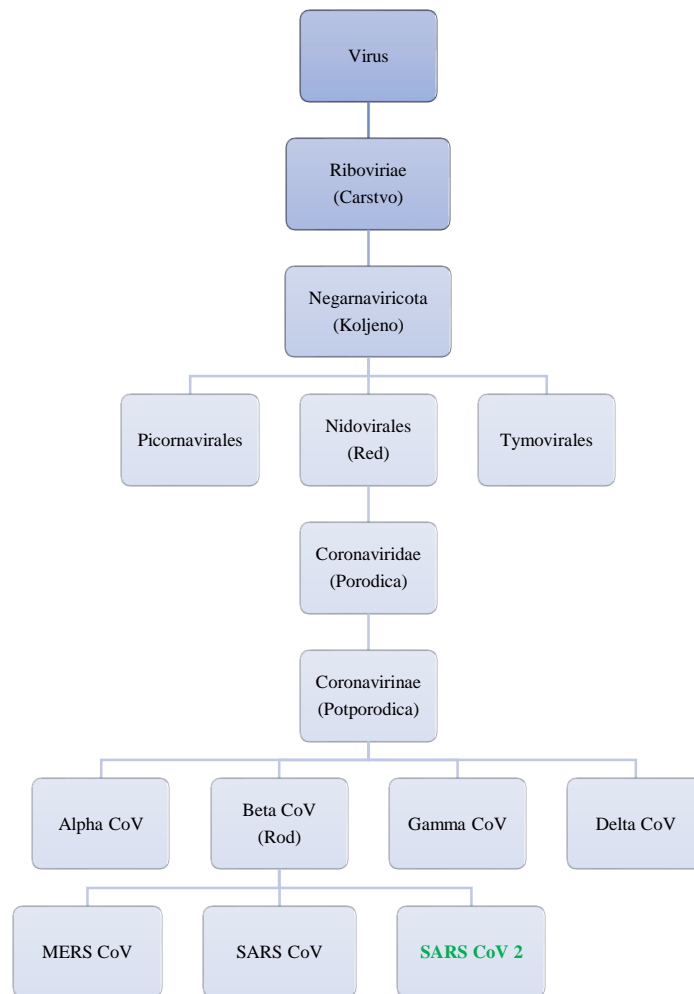
namijenjeni za konzumaciju sirovi i pripremljena hrana spremna za konzumaciju (engl. ready-to-eat; RTE) (WHO/FAO, 2008). RTE hrana koja je povezana s incidentima virusnih bolesti koje se prenose hranom uključuje sirovu ili kuhanu hranu kojom se dodatno rukuje, a koja se poslužuje hladna ili na sobnoj temperaturi.

Do sada nisu pronađeni dokazi da je put prijenosa virusa SARS-CoV-2 konzumacija gotove hrane što potvrđuju brojne studije i procjene rizika (Han i sur., 2021; Bosch i sur., 2018; Herstein i sur., 2021; EFSA, 2020; FDA, 2023; ANSES, 2020; FSA, 2020; FSANZ, 2021). Međutim prijenos virusa putem kontakta s površinama kontaminiranim virusom SARS-CoV-2 još uvijek nije razjašnjen. Takvo stanje ukazuje na potrebu provedbe ovakvih studija, ali i općenito više učenja i razvoja metoda izolacije virusa iz okoliša, s posebnom pažnjom na zalihe vode i na hranu općenito.

## **2.1 Koronavirusi**

### 2.1.1 Klasifikacija koronavirusa

Koronavirusi (CoV) pripadaju obitelji *Coronaviridae*, redu *Nidovirales* i rodu *Coronavirus*, a općenito su kategorizirani u četiri važna roda koji uključuju alfakoronaviruse, betakoronaviruse, gamakoronaviruse i deltakoronaviruse prvenstveno grupirane na temelju serologije i filogenetske klasterizacije (podjele na temelju staništa/genetske povezanosti) (Pal i sur., 2020). Grupa RNK virusa klasificirana je u tri reda koji uključuju red *Nidovirales*, a koji se nadalje klasificiraju u četiri porodice: *Coronaviridae*, *Arteriviridae*, *Mesoniviridae* i *Roniviridae*. Porodica *Coronaviridae* dalje se dijeli na dvije potporodice: *Coronavirinae* i *Torovirinae*. Potporodica *Coronavirinae* uključuje četiri roda virusa (Fehr i Perlman, 2015). Detaljna klasifikacija zajedno s podrijetlom SARS-CoV-2 prikazana je na slici 1.



Slika 1. Klasifikacija RNK skupine virusa i porijeklo SARS CoV-2 (Pal i sur., 2020).

Najnoviji otkriveni član koronavirusa koji može zaraziti ljude identificiran je u gradu Wuhanu u Kini i službeno je nazvan SARS-CoV-2. Prema Međunarodnom odboru za taksonomiju virusa novootkriveni virus smatra se jedinstvenim sojem virusa za koje dosad nije uočeno da ima sposobnost zaraze ljudi (Pal i sur., 2020).

Koronavirusi imaju mogućnost iznimne prilagodljivosti domaćinu te su zbog toga široko rasprostranjeni među različitim životinjskim vrstama poput maskiranih palminih cibetki, miševa, pasa, mačaka, deva, svinja, kokoši i šišmiša koji su njihov najveći prirodni rezervoar, ali i među ljudima kod kojih može uzrokovati razvoj teške bolesti (Pal i sur., 2020; Cui i sur., 2019). Iz epidemiološke točke gledišta, koronavirusi čine najveću skupinu virusa uzročnika respiratornih i gastrointestinalnih infekcija.

Morfološki gledano, koronavirusi su obično sfernog oblika ili pleomorfni, duljine između 80 i 160 nm. Imaju mali genom veličine 27 – 32 kilobajta (kB) s jedinstvenom strategijom replikacije (Sahin, 2020). Omotani su ovojnicom koja se u elektronskim mikrografima formira



kao zaseban par elektronski gustih ljuski (Neuman i sur., 2006; Fehr i Perlman, 2015). Ovojnica je sačinjena od lipidnog dvosloja na kojem su usidreni strukturni proteini na peplomerima (S), ovojnica (E) i membrana (M) (Lai i Cavanagh, 1997). Nadalje, ispod ovojnice je nukleokapsida formirana od višestrukih kopija nukleokapsidnog (N) proteina koji su vezani za jednolančani RNK genom (Fehr i Perlman, 2015; Chang i sur., 2014). Ovojnica lipidnog dvosloja, membranski proteini i nukleokapsida imaju ulogu zaštite virusa kada se nalazi izvan domaćina (Neuman i sur., 2011). Imaju nesegmentiranu, jednolančanu ribonukleinsku kiselinu u pozitivnom smislu (+ssRNA) kao svoj nuklearni materijal (Tombuloglu i sur., 2021). Koronavirusi su ime dobili po izbočenim oligomerima šiljastog glikoproteina (S) koji tvore koronarni rub oko viriona, što se posebno dobro vidi na prikazu elektronskim mikroskopom gdje se vidi karakterističan izgled koji podsjeća na krunu (Ksiazek i sur., 2003; Lai i Cavanagh, 1997). Nukleoproteinske molekule (N) i pozitivno-lančani genom čine jezgru ribonukleoproteina (RNP), a glavna komponenta virusne membrane je troprolazni transmembranski matrični glikoprotein (M) koji je bitan za sastavljanje virusa (Lai i Cavanagh, 1997).

### 2.1.2 Koronavirusi s epidemiološkim značajem za ljude u odnosu s novootkrivenim virusom SARS-CoV-2

Virus koji je izoliran iz prvih bioloških uzoraka nakon identifikacije i sekvenciranja cijelog genoma svrstan je u jedan od četiri roda (alfa-, beta-, gama- i delta-) koronavirusa, točnije u betakoronaviruse ( $\beta$ -CoV ili beta-CoV) u koje pripadaju dva epidemiološki najznačajnija koronavirusa za ljude. Prvi je virus uzročnik teškog akutnog respiratornog sindroma (engl. Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS-CoV-1) porijeklom iz kineske pokrajine Guangdong, a drugi je virus uzročnik bliskoistočnog respiratornog sindroma (engl. Middle East Respiratory Syndrome, MERS-CoV) porijeklom iz Saudijske Arabije (Zhu, i sur., 2020; Anelich i sur., 2020).

Pregledom dostupne literature Rajpal i sur. (2022) saželi su sve koronaviruse značajne za ljude, ističući kako je identificirano sedam ljudskih koronavirusa (HCoV), od prvih izoliranih sredinom 1960-ih pa sve do danas. Virusi HCoV-OC43 i HCoV-HKU1 pripadaju betakoronavirusima linije A, dok su HCoV-229E i HCoV-NL63 alphakoronavirusi. Zaključeno je kako ovi koronavirusi pripadaju u uzročnike obične prehlade i blagih infekcija gornjih dišnih puteva. S druge su strane, betakoronavirusi linija B i C linija (uključujući SARS-CoV i MERS-CoV), značajno virulentniji virusi koji uzrokuju teške respiratorne probleme i koji mogu dovesti

do epidemija, što se ponovno potvrdilo kroz ovu aktualnu pandemiju. Popis najznačajnijih HCoV-a s njihovom prevalencijom, infektivnosti i receptorima prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Ljudski koronavirusi: prevalencija, infektivnost i receptori Rajpal i sur. (2022)

Koronavirus	Godina	Prirodni domaćin	Posredni domaćin	Razina bolesti	Broj zaraženih	Stopa smrtnosti	Receptori
HCov-229E	1960.	Šišmiš	Dromedarne deve	Blaga	15 – 30 %	-	ljuska aminopeptidaza N (hAPN)
HCov-OC43	1960.	Štakor	Govedo	Blaga	15 – 30 %	-	O-acetilirana sijalična kiselina
HCov-NL63	2004.	Šišmiš	Neidentificiran o	Blaga	15 – 30 %	-	ACE2
HCov-HKU1	2005.	Štakor	Neidentificiran o	Blaga	15 – 30 %	-	O-acetilirana sijalična kiselina
SARS-CoV	2002. – 2003.	Šišmiš	Civet mačka	Akutna, fatalna	~ 8 000	~ 10 %	ACE2
MERS-CoV	Od 2012. –	Šišmiš	Dromedarne deve	Akutna, fatalna	~ 1 700	~ 36 %	di-peptidil peptidaza 4 (DPP4)
SARS-CoV-2	Od 2019. –	Šišmiš	Ljuskavci (Pangolin)	Akutna, fatalna	Više od 650 milijuna (na dan 5.5.2023.)	3 – 5 %	ACE2 i transmembranski serin proteaza 2 (TMPSSR2)

Prvi betakoronavirus koji je uzrokovao globalno značajnu pandemiju bio je SARS-CoV pred kraj 2002. godine, dok podaci o smrtnosti variraju od 7 – 15 % (Anderson i sur., 2004; Anelich i sur., 2020). Pandemija je stavljena pod kontrolu već do ljeta 2003. godine te od 2004. nije zabilježen niti jedan novi slučaj SARS-a (Peeri i sur., 2020). Ukupan broj zaraženih osoba bio je 8 096 (WHO, 2023). Za drugi slučaj globalne pandemije zaslužan je MERS-CoV koronavirus koji se pojavio 2012. godine, a koji je i danas aktivan s 2 600 potvrđenih zaraženih osoba i smrtnosti od 34 – 36 % (ECDC, 2021; Anelich i sur., 2020; WHO, 2022).

Ono što SARS-CoV-2 razlikuje od prethodnika jest visok stupanj zaraznosti koji se izražava osnovnim reprodukcijskim brojem ( $R_0$ ). Taj broj se naziva i osnovni omjer, stopa reprodukcije ili osnovna reproduktivna stopa, a predstavlja oblik epidemiološke mjerne jedinice koja se koristi za opisivanje zaraznosti ili prenosivosti zaraznih agenasa. Na  $R_0$  utječu brojni biološki, društveno-bihevioralni i okolišni čimbenici koji uvjetuju prijenos patogena. Za izračun se koriste različite vrste složenih matematičkih modela zbog kojih se  $R_0$  često može pogrešno prikazati, pogrešno protumačiti i pogrešno primijeniti (Delamater i sur., 2019). Reprodukcijski broj SARS-CoV-2 je prema Sanche i sur. (2020) bio 5.7, dok se prema Anelich i sur. (2020)

kretao između 2 – 3. Za usporedbu  $R_0$  vrijednost za iznimno smrtonosan MERS-CoV je prema Anelich i sur. (2020) u početku pandemije bila iznad 2 da bi se kasnije stabilizirala oko 0.45, a prema Cauchemez i sur. (2014)  $R_0$  se kretao između 0.8 – 1.3. Svi ovi podaci potvrda su koliko je važno pokušati spoznati sve mogućnosti prijenosa uključujući i prijenos kontaktno preko površina hrane ili ingestijom hrane, a iz aspekta ovog rada posebno preko površine ambalaže hrane.

S obzirom na navedene činjenice, realno je u budućnosti očekivati kako će se čovječanstvo, prije ili kasnije, suočiti s još značajnijim virusom koji će imati približnu patogenost MERS-a i potencijal širenja SARS-CoV-2 ili čak veću.

## **2.2   Mogućnosti širenja koronavirusa SARS-CoV-2 putem hrane**

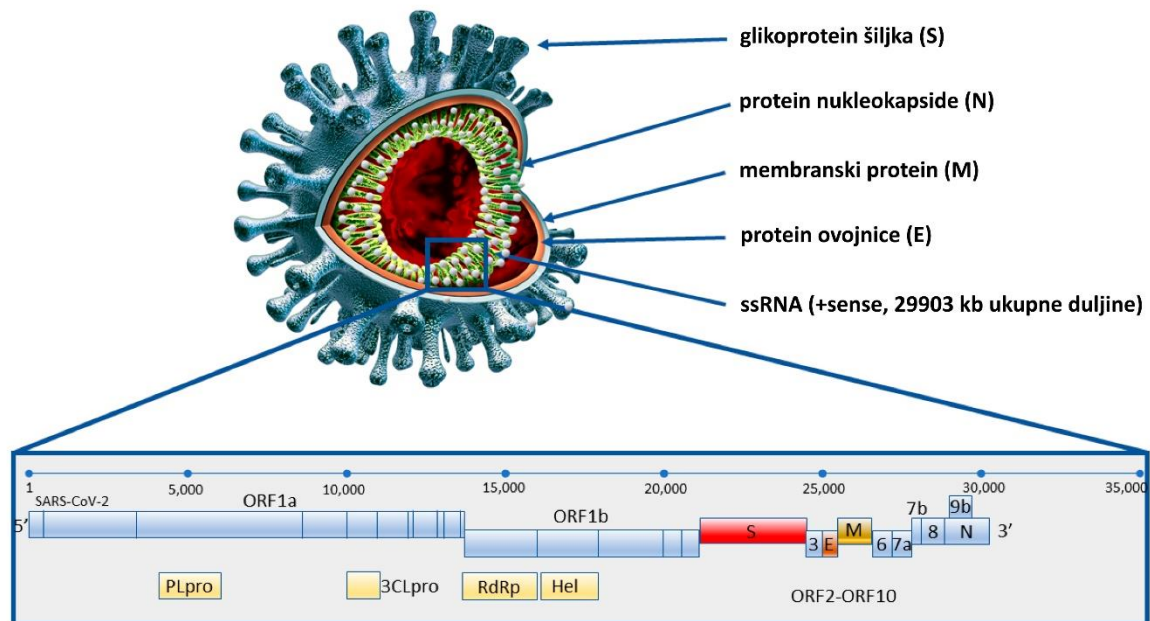
Prvi slučajevi zaraze koronavirusom SARS-CoV-2, iako službeno nisu potvrđeni, povezivali su se s konzumacijom tradicionalne juhe od šišmiša, a mnoga žarišta vezala su se za takozvane mokre tržnice i skladišta hranom, odnosno hladne lance u transportu hranom. Uz tu primarnu tezu „prvog slučaja“ prelaska virusa na ljude, alternativna teza koju zagovaraju i kineske vlasti jest da je virus importiran u Kinu i to putem transporta smrznute hrane (Han i sur., 2021). Unatoč tome što se radi o primarno respiratornom virusu, a uzimajući u obzir činjenice kako obje teze uključuju hranu kao put prijenosa virusa, indikativno je kako hrana možda ima veću ulogu nego se to prvotno mislilo. Virus je već napravio veliki skok sa životinjskih vrsta na ljude, a pitanje je hoće li i kada napraviti manji skok s jednog primarnog sustava organa na druge. Ili će se možda dogoditi pojava potpuno novog virusa sa sličnom dinamikom širenja, a tada će ovakva istraživanja biti od velikog značaja.

Prema radu Huang i sur. (2021) pokazalo se da je usna šupljina potencijalno važno mjesto za infekciju SARS-CoV-2 te da virus može inficirati žlijezde slinovnice i sluznicu usne šupljine, što upućuje da je slina potencijalni put prijenosa SARS-CoV-2. Čak je i Europska agencija za sigurnost hrane (engl. European Food Safety Authority, EFSA) zaključila kako su nova *in vitro* ispitivanja (korištenjem staničnih kultura i organoida) pokazala mogućnost crijevne infekcije SARS-CoV-2 (Cheung i sur., 2020; EFSA, 2023; Guo i sur., 2021). Ipak, EFSA naglašava da je glavni put prijenosa SARS-CoV-2 s osobe na osobu, uglavnom putem respiratornih kapljica koje zaražene osobe kišu, kašlju ili izdišu (respiratorni put) te kako nema dokaza da hrana predstavlja rizik za javno zdravlje u odnosu na SARS-CoV-2.

SZO u svom znanstvenom izvještaju također navodi kako "Postoje dokazi da infekcija COVID-19 može dovesti do crijevne infekcije i biti prisutna u fecesu." (WHO, 2020c). Ipak se naglašava kako do sada takav put prijenosa nije potvrđen. Važno je biti svjestan činjenice da dišni sekret ili kapljice zaraženih ljudi mogu kontaminirati površine i predmete. Ovisno o ambijentalnom okruženju i vrsti površine virus SARS-CoV-2 može biti prisutan na tim površinama u razdobljima u rasponu od nekoliko sati do nekoliko tjedana, a u idealnim uvjetima očuvanja i do nekoliko mjeseci. Kao rezultat može se dogoditi neizravan prijenos preko površina, odnosno preko predmeta kontaminiranih virusom, a zatim dodirnom usta, nosa ili očiju. S obzirom na kontinuirano otkrivanje kontaminacije okoliša u području oko zaraženih i oboljelih osoba te na činjenicu da se drugi koronavirusi i respiratorni virusi mogu prenijeti na ovaj način, SZO u jednom od svojih izvještaja ističe kako se prijenos preko kontaminiranih površina smatra vjerojatnim oblikom prijenosa za SARS-CoV-2 (WHO, 2020c, 2020d). U prilog tome idu i neobjavljeni rezultati studije provedene u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo "Dr. Andrija Štampar". U studiji se pratila kontaminacija površina u prostorima (karanteni) u kojima su boravile osobe kojima je dokazana bolest COVID-19 s blagim simptomima ili bez izraženih simptoma. Rezultati su pokazali kako su virus SARS-CoV-2, ili njegovi fragmenti, prisutni na preko 30 % ispitanih površina. Postavlja se pitanje kakvi bi učinci bili ako bi takve osobe radile u pripremi ili u prometu s hranom. Han i sur. (2021) u svom radu prikazuju niz žarišta koja su se razvila u restoranima, hladnjačama, skladištima hranom i tržnicama gdje je gotovo uvijek u pozadini bio hladni lanac koji virusu omogućava znatno dulje preživljavanje, a kod ostalih koronavirusa (uključujući SARS-CoV-1) čak do 49 dana. Druga studija potvrdila je kako je virus izoliran i nakon 28 dana na 20 °C s uobičajenih površina kao što su staklo, nehrđajući čelik te papirnate i polimerne novčanice s napomenom kako je početno virusno opterećenje bilo jednako najvišim titrima izoliranima kod zaraznih pacijenata (Riddell i sur., 2020). Treba napomenuti kako je u istoj studiji u nekoliko primjera s drugim površinama, zarazni virus preživio manje od 24 sata pri 40 °C. Iz rezultata navedene studije ponovno se može vidjeti kako je važno na kakvim površinama se virus izvorno nalazi i koliko te površine mogu utjecati na njegovo preživljavanje i zaraznost.

## 2.3 Izolacija i detekcija virusa SARS-CoV-2

Trenutno su na tržištu dostupni brojni komercijalni kitovi za izolaciju RNK kao i brojni kitovi za otkrivanje različitih genomskih sekvenci nukleotida virusa SARS-CoV-2, odnosno pojedinih proteina. Najčešće su to ORF1ab poliprotein (P, 7 096 aminokiselina), glikoprotein šiljka (S, 1 273 aminokiseline), protein nukleokapside (N, 419 aminokiselina), protein ovojnice (E, 75 aminokiselina) i membranski protein (M, 222 aminokiseline), a preporuka je provesti ispitivanje i potvrdu više genskih skupina (Khan i sur., 2020; Liu i sur., 2020; WHO, 2020b). Vizualizacija genoma SARS-CoV-2 virusa i položaj navedenih genskih sekvenci prikazani su na slici 2 (Kubina i Dziedzic, 2020).



Slika 2. Vizualizacija genoma SARS-CoV-2 virusa i položaj pojedinih genskih sekvenci (Kubina i Dziedzic, 2020).

Ono što se pokazalo kao dodatni problem pri izolaciji RNK jest obrada uzoraka na način koji bi osigurao maksimalan oporavak (engl. recovery) virusnih čestica iz uzorka, obzirom da se u takvim uzorcima virusne čestice nalaze u relativno malim količinama, često na granici detekcije metode. Za različite ciljane gene i različite komercijalne kitove obično su i različite granice detekcije. Primjerice, proizvođač kitova za otkrivanje SARS-CoV-2 gena korištenih za potrebe ovog rada procijenio je osjetljivost kitova kroz provedbu analize granice detekcije (engl. Limit

of Detection; LOD) te je za prvi kit koji je korišten za probir, *VIRSeek SARS-CoV-2 Screen*, utvrđena granica detekcije od dvije kopije po reakciji, a za drugi potvrđni kit, *VIRSeek SARS CoV-2 Ident* utvrđena granica detekcije od pet kopija po reakciji (Eurofins, 2020a). Kroz rad s različitim komercijalnim kitovima za izolaciju RNK ispostavilo se da kitovi mogu dati bolje ili lošije rezultate, odnosno različit prinos RNK ovisno o korištenju etanola, izopropanola ili nekog drugog alkohola u koraku koncentriranja. U dijelu ovog rada posebna pažnja posvetila se usporednom ispitivanju kontrolirano kontaminiranih uzoraka kako bi se izdvojio najučinkovitiji protokol za provedbu izolacije RNK iz prikupljenih uzoraka. Nakon izolacije RNA slijedi ispitivanje prisutnosti ciljanog analita metodom lančane reakcije polimerazom s reverznom transkripcijom u stvarnom vremenu (real-time RT-PCR), odnosno otkrivanje prisutnosti koronavirusa i potencijalne prisutnosti SARS-CoV-2 virusa na pakiranjima hrane, na i u hrani, a na osnovu dobivenih rezultata ispitivanja utvrđivanje značajnosti hrane kao vektora za prijenos koronavirusa.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Materijali

Za ispitivanje prisutnosti virusa SARS-CoV-2 u lancu hrane bilo je potrebno procijeniti i odabrati najprikladnije uzorke, izdvojiti najučinkovitiji kit za izolaciju virusne ribonukleinske kiseline (RNK) kroz procjenu izvedbenih karakteristika izabranih komercijalno dostupnih izolacijskih kitova i provesti ispitivanja kitovima prikladnim za otkrivanje virusa SARS-CoV-2. Uzorci planirani za ispitivanje prisutnosti virusa u lancu hrane podijeljeni su u dvije skupine. Prvu skupinu čine okolišni uzorci, odnosno dvije podskupine - brisevi površina ambalažnog materijala pakiranja hrane i brisevi direktnih površine hrane. Drugu skupine uzoraka čine također dvije podskupine gotovih jela spremnih za konzumaciju - topla gotova jela čuvana na temperaturama  $> 65\text{ }^{\circ}\text{C}$  i hladna gotova jela (salate) čuvana na temperaturama  $< 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

##### 3.1.1 Uzorci

Uzimajući u obzir dosadašnja ispitivanja i iskustvo stečeno u dugogodišnjem radu na kontroli kvalitete i zdravstvene ispravnosti prostora, pribora, opreme i djelatnika u pripremi i prometu hranom te namirnica prema različitim mikrobiološkim kriterijima, odabrani su i uzorkovani uzorci obje spomenute skupine uzoraka. Uzorci briseva uzeti su u hladnjači i zamrzivaču velikog trgovačkog centra. Izuzeti su površinski brisevi uzoraka hrane ( $N = 60$ ), tvornički zapakirane i nepakirane, svježe (čuvane na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) i smrznute (čuvane na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) hrane, uvoznog i domaćeg porijekla. Površinski uzorci uzeti su pomoću plastičnih štapića sa sintetičkim vrhom, prethodno namočenih u sterilnu otopinu – fosfatni pufer (PBS). Preporučena površina brisanja je  $25 - 100\text{ cm}^2$ , ali gdje god je to bilo moguće uzeta je površina od približno  $100\text{ cm}^2$  kako bi se povećala mogućnost otkrivanja virusa.

Uzorci gotovih jela ( $N = 40$ ), točnije 18 hladnih i 22 topla gotova jela, izuzeti su iz toploteka nekoliko različitih trgovačkih centara. Naime, u odjelima toploteka hrana se nalazi u rinfuzi i najčešće su posude u kojim se hrana čuva otvorenog tipa te je hrana dodatno izložena vanjskoj kontaminaciji dodirrom, kašljanjem, kihanjem i curenjem nosa. Uzorkovano je približno  $200\text{ g/mL}$  gotovih jela po uzorku.

Sa svih površina uzoraka hrane i površina pakiranja hrane uzorak brisa uzet je *in situ*, dok su uzorci toplih i hladnih gotovih jela uzorkovani u sterilne PVC spremnike. Svi uzorci pažljivo su označeni nakon čega su odmah transportirani u prijenosnim hladnjacima s ledenim ulošcima u laboratorij na analizu. Uzorci briseva i hrane transportirani su i čuvani na  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.1.2 Kitovi za izolaciju RNK

- Absolutely RNA Miniprep kit (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
- RealLine Extraction 100 kit (Bioron Diagnostics GmbH, Romerberg, Njemačka)
- VIRSeek RNAExtractor kit (Eurofins GeneScan Technologies GmbH, Freiburg, Njemačka)
- QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Njemačka).

### 3.1.3 Kitovi za detekciju koronavirusa/SARS-CoV-2/MNV

- VIRSeek SARS-CoV-2 Screen (Eurofins GeneScan Technologies GmbH, Freiburg, Njemačka)
- VIRSeek SARS-CoV-2 Ident 2 (Eurofins GeneScan Technologies GmbH, Freiburg, Njemačka)
- VIRSeek SARS-CoV-2 Mplex (Eurofins GeneScan Technologies GmbH, Freiburg, Njemačka)
- VIRSeek Murine Norovirus (Eurofins GeneScan Technologies GmbH, Freiburg, Njemačka).

### 3.1.4 Hranjive podloge i diluenti

- a) Osnovni diluent – puferirana peptonska voda (PPV) sastava: pepton 10,0 g, natrijev klorid 5,0 g, dinatrijev hidrogenfosfat dodekahidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 9,0 g, kalijev dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1,5 g, voda 1 000 mL. Priprema: sve komponente otopljene su u vodi, a pH podešen na  $7,0 \pm 0,2$  pri 25 °C.
- b) Podloge za dokazivanje *Salmonella* spp.
  - Rappaport-Vassiliadis soja bujon (RVS) sastava: enzimatski hidrolizat soje 5 g, natrijev klorid 8 g, kalijev dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1,4 g, dikalijev hidrogen fosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 0,2 g, bezvodni magnezijev klorid  $\text{MgCl}_2$ , malahit zeleni oksalat 0,4 g, voda 1 000 mL. Priprema: sve komponente otopljene su u kipućoj vodi, a pH podešen na  $5,2 \pm 0,2$  pri 25 °C. Nakon pripreme, bujon je steriliziran 15 minuta u autoklavu postavljenom na 115 °C i skladišten u sterilnim epruvetama od 10 mL.



- Muller-Kauffmann tetrationsat-novobiocin bujon (MKTTn ) sastava: mesni ekstrakt 4,3 g, enzimatski hidrolizat kazeina 8,6 g, natrijev klorid 2,6 g, kalcijev karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) 38,7 g, natrijev tiosulfat  $\times 5 \text{ H}_2\text{O}$  47,8 g, volova žuč za bakteriološku upotrebu 4,78 g, brilliant green 9,6 mg, novobiocin natrijeva sol 0,04 g, voda 1 000 mL. Priprema: sve komponente otopljene su u vodi i kratko zagrijane do vrenja. Nakon hlađenja dodano je 20 mL otopine joda i kalijevog jodida. Tijekom pripreme bujon je aseptički raspoređen u epruvete od 10 mL te je mutan i karakteristično zelene boje s bijelim talogom (kalcijev karbonat). Vrijednost pH na 25 °C u rasponu je od 7,8 – 8,2.
- Ksilozna lizin deoksikolatni agar (XLD) sastava: ekstrakt kvasca 3,0 g, natrijev klorid ( $\text{NaCl}$ ) 5,0 g, ksiloza 3,75 g, laktoza 7,5 g, saharoza 7,5 g, L-lizin hidroklorid 5,0 g, natrijev tiosulfat 6,8 g, željezo (III) amonijev citrat 0,8 g, fenol crveno 0,08 g, natrijev deoksikolat 1,0 g, agar 14 g, voda 1 000 mL. Priprema: sve komponente otopljene su u vodi uz zagrijavanje i često miješanje, do ključanja. Vrijednost pH podešen je na  $7,4 \pm 0,2$  pri 25 °C. Medij je razliven u sterilne Petrijeve zdjelice te čuvan na 5 °C.
- Salmonella-Shigela agar (SS) sastava: mesni ekstrakt 5,0 g, pepton 5,0 g, laktoza 10,0 g, volova žuč 8,5 g, natrijev citrat 10,0 g, natrijev tiosulfat 8,5 g, željezo citrat 1,0 g, brilliant green 0,3 mg, neutralno crvena 25 mg, agar 15 g, voda 1 000 mL. Priprema: sve komponente su otopljene u vodi zagrijavanjem, uz često miješanje, do ključanja. Medij je ohlađen do 50 °C i razliven u sterilne Petrijeve zdjelice. Čuvano na 5 °C.
- Biokemijski test u nizu API 20 E (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, Francuska).

c) Podloge za dokazivanje *Listeria monocytogenes/Listeria* spp.

- Otopina litijeva klorida sastava: litijev klorid 3,0 g, voda 10 mL.
- Otopina natrijeve soli nalidiksične kiseline sastava: natrijeva sol nalidiksične kiseline 0,1 g, natrijev hidroksid, 0,05 mol/l otopina 10 mL.
- Otopina akriflavin hidroklorida sastava: akriflavin hidroklorid 0,25 g, voda 100 mL.
- Otopina amonijeva željezo (III) citrata sastava: amonijev željezo (III) citrat 5,0 g, voda 100 mL.
- Otopina nalidiksične kiseline sastava: natrijeva sol nalidiksične kiseline 0,02 g, natrijev hidroksid (0,05 mol/l) 5 mL.

- Otopina ceftazidima sastava: ceftazidim 0,02 g, voda 5 mL.
- Otopina polimiksina B sastava: polimiksin B sulfat 76 700 IU, voda 5 mL.
- Otopina cikloheksimida sastava: cikloheksimid 0,05 g, etanol 2,5 mL, voda 2,5 mL.
- Dodatak sastava: 2 g 1- $\alpha$ -fosfatidilinozitola otopljeno je u 50 mL vode uz miješanje oko 30 minuta, dok se nije dobila homogena suspenzija. Autoklavirano na 121 °C 15 minuta i ohlađeno na 47 °C – 50 °C.
- Selektivni primarni medij za obogaćivanje - Half-Fraser bujon sastava: enzimatski hidrolizat životinjskih tkiva 5,0 g, enzimatski hidrolizat kazeina 5,0 g, mesni ekstrakt 5,0 g, ekstrakt kvasca 5,0 g, natrijev klorid 20,0 g, dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat 12,0 g, kalijev dihidrogenfosfat 1,35 g, eskulin 1,0 g, voda 1 000 mL. Priprema: sve komponente otopljene su u vodi uz zagrijavanje, a pH podešen je tako da je nakon sterilizacije bio  $7,2 \pm 0,2$  na 25 °C. Nakon pripreme, medij je stavljen u tikvice odgovarajućeg kapaciteta nakon čega je steriliziran 15 minuta u autoklavu na 121 °C. Otopina litijeva klorida i otopina nalidiksične kiseline dodane su bazi prije autoklaviranja, a ostale otopine neposredno prije korištenja medija.
- Selektivni sekundarni medij za obogaćivanje - Fraser bujon sastava: enzimatski hidrolizat životinjskih tkiva 5,0 g, enzimatski hidrolizat kazeina 5,0 g, mesni ekstrakt 5,0 g, ekstrakt kvasca 5,0 g, natrijev klorid 20,0 g, dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat 12,0 g, kalijev dihidrogenfosfat 1,35 g, eskulin 1,0 g, litijev klorid 3,0 g, natrijeva sol nalidiksične kiseline 0,02 g, voda 1 000 mL. Priprema: sve komponente otopljene su u vodi uz zagrijavanje, a pH je podešen tako da nakon sterilizacije bio  $7,2 \pm 0,2$  pri 25 °C. Nakon pripreme medij je stavljen u tikvice odgovarajućeg kapaciteta nakon čega je steriliziran 15 minuta u autoklavu na 121 °C. Neposredno prije upotrebe, u svaku epruvetu (volumena od 10 mL) baze dodano je 0,1 mL otopine akriflavin hidroklorida i otopine amonijevog željezo (III) citrata i lagano promiješano.
- *Listeria* agar prema Ottaviani i Agosti sastava osnovnog medija: enzimatski hidrolizat životinjskih tkiva 18,0 g, enzimatski hidrolizat kazeina 6,0 g, ekstrakt kvasca 10,0 g, natrijev piruvat 2,0 g, glukoza 2,0 g, magnezijev glicerofosfat 1,0 g, magnezijev sulfat (bezvodni) 0,5 g, natrijev klorid 5,0 g, litijev klorid 10,0 g, dinatrijev hidrogenfosfat (bezvodni) 2,5 g, 5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -d-glukopiranozid 0,05 g, agar 15,0 g, voda 1 000 mL. Priprema: sve komponente otopljene su u vodi uz zagrijavanje. Vrijednost pH nakon sterilizacije bila je  $7,2 \pm$

0,2 pri 25 °C. Potpuni medij dobio se miješanjem 930 mL osnovnog medija otopljenog na 47 °C – 50 °C, a uz temeljito miješanje dodano je 5 mL otopine nalidiksične kiseline, 5 mL otopine ceftazidima, 5 mL otopine polimiksina B, 5 mL otopine cikloheksimida i 50 mL dodatka, a pH cjelokupnog medija bio je  $7,2 \pm 0,2$  pri 25 °C. U svaku Petrijevu zdjelicu razliveno je 18 mL – 20 mL svježe pripremljenog cjelovitog medija koji je zatim ostavljen da se stvrdne.

- PALCAM *Listeria* selektivni agar sastava: pepton 23,0 g, škrob 1,0 g, natrijev klorid 5,0 g, D-manitol 10,0 g, amonijev fericitrat 0,5 g, eskulin 0,8 g, glukoza 0,5 g, litijev klorid 15,0 g, fenol crveno 0,08 g, agar 13,0 g, voda 1 000 mL. Priprema: sve komponente otopljene su u vodi, pH je podešen na  $7,0 \pm 0,2$  na 25 °C. Medij je steriliziran 15 minuta u autoklavu na 121 °C, ohlađen na 50 °C, nakon čega je dodan otopljeni sadržaj 2 bočice PALCAM *Listeria* selektivnog dodatka.
  - Biokemijski test u nizu API *Listeria* (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, Francuska).
- d) Podloga za određivanje hemolitičke aktivnosti – krvni agar (KA) sastava: enzimatski hidrolizat životinjskih tkiva 15,0 g, jetreni hidrolizat 2,5 g, ekstrakt kvasca 5,0 g, natrijev klorid 5,0 g, agar 14,0 g, voda 1 000 mL. Priprema: sve komponente otopljene su u vodi, a pH podešen na  $7,2 \pm 0,2$  pri 25 °C. Medij je razliven u sterilne Petrijeve zdjelice i čuvan na 5 °C.
- e) Podloga za određivanje ukupnog broja mikroorganizama – Plate Count Agar (PCA) sastava: enzimatski hidrolizat kazeina/tripton 5,0 g, ekstrakt kvasca 2,5 g, glukoza 1,0 g, agar 14,0 g, voda 1 000 mL. Priprema: sve komponente otopljene su u kipućoj vodi uz često miješanje i sterilizirane 15 minuta u autoklavu postavljenom na 121 °C, dok je pH podešen između 6,8 – 7,2 pri 25 °C.
- f) Podloge za brojanje i potvrdu *Enterobacteriaceae*
- VRBG (Violet Red Bile Glucose) agar sastava: enzimatski hidrolizat životinjskih tkiva 7 g, ekstrakt kvasca 3 g, natrijev klorid 5 g, žučne soli 1,5 g, glukoza 10 g, neutralno crveno 0,03 g, kristal violet 0,002 g, agar 15 g, voda 1 000 mL. Priprema: sve komponente otopljene su u kipućoj vodi, pH podešen na  $7,4 \pm 0,2$  na 25 °C. Nakon pripreme podloga je skladištena u sterilnim bočicama, a sama podloga pripremljena je neposredno prije upotrebe te iskorištena unutar 4 sata od pripreme.

- Glukozni OF medij sastava: enzimatski hidrolizat kazeina 2,0 g, dikalijev hidrogen fosfat ( $K_2HPO_4$ ) 0,3 g, glukoza 10,0 g, natrijev klorid 5,0 g, bromtimol plavo 0,08 g, agar 3,5 g, voda 1 000 mL. Priprema: sve komponente otopljene su u vodi, a pH podešen na  $6,8 \pm 0,2$  pri 25 °C. Nakon pripreme hranjivi medij razliven je u epruvete od 10 mL i steriliziran 15 minuta u autoklavu postavljenom na 121 °C. Čuvano na  $5 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$ .
- g) Podloga za brojanje *Bacillus cereus/Bacillus* spp. - Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (MYP) sastava: mesni ekstrakt 1,0 g, pepton 10,0 g, manitol 10,0 g, natrijev klorid 10,0 g, fenol crveno 0,025 g, agar 12,0 g, 20 % emulzija žumanjka 100 mL, polimiksin B 100 000 IU, voda 1 000 mL. Priprema: svi sastojci osim polimiksina B suspendirani su u vodi. Sterilizacija u autoklavu pri 121 °C kroz 15 minuta, a nakon hlađenja na približno otprilike 49 °C aseptički je dodano 100 mL emulzije žumanjka i 100 000 IU polimiksina B, nakon čega je medij dobro promiješan i razliven u sterilne Petrijeve zdjelice.
- h) Podloga za brojanje plijesni – Dichloran-Rose Bengal Chloramphenicol agar (DRBC) sastava: enzimatski hidrolizat biljnih i životinjskih tkiva 5,0 g, D-glukoza ( $C_6H_{12}O_6$ ) 10,0 g, kalijev dihidrogen fosfat ( $KH_2PO_4$ ) 1,0 g, magnezijev sulfat ( $MgSO_4 \cdot H_2O$ ) 0,5 g, dikloran (2,6-dikloro-4-nitroanilin) 0,002 g, rose bengal 0,025 g, agar 12 g – 15 g, kloramfenikol 0,1 g, voda 1 000 mL. Priprema: svi sastojci osim kloramfenikola otopljeni su u vodi, pH je podešen na  $5,6 \pm 0,2$  na 25 °C. Dodano je 10 mL 1 % (masene koncentracije) otopine kloramfenikola u etanolu i promiješano. Sterilizacija u autoklavu pri 121 °C kroz 15 minuta, nakon čega je medij odmah ohlađen u vodenoj kupelji održavanoj na temperaturi od 44 °C – 47 °C i u količini od 15 mL razliven u sterilne Petrijeve zdjelice. Čuvano na 5 °C.
- i) Podloga za brojanje koagulaza pozitivnih stafilokoka/*Staphylococcus aureus* - Rabbit Plasma Fibrinogen Agar (RPFA) sastava za osnovni medij: enzimatski hidrolizat kazeina 10,0 g, mesni ekstrakt 5,0 g, ekstrakt kvasca 1,0 g, L-glicin 12,0 g, natrijev piruvat 10,0 g, litijev klorid 5,0 g, agar 15,0 g, voda 1 000 mL. Dodaci koji se dodaju nakon autoklaviranja (na 90 mL medija): otopina kalijevog telurita 0,25 mL, otopina govedeg fibrinogena 7,5 mL, zečja plazma i otopina inhibitora tripsina 2,5 mL. Priprema: osnovni medij je rastopljen, nakon čega je ohlađen na 44 °C – 47 °C u vodenoj

kupelji, aseptički su dodane tri otopine (prethodno zagrijane na 44 °C – 47 °C u vodenoj kupelji). Poslije svakog dodavanja medij je temeljito promiješan kako bi se izbjeglo stvaranje pjene te je korišten neposredno nakon pripreme da bi se izbjeglo bilo kakvo taloženje plazme.

- j) Podloga za brojanje sulfitreducirajućih klostridija - Iron Sulfite Agar (ISA) sastava: pepton 15,0 g, enzimatski hidrolizat soje 5,0 g, ekstrakt kvasca 5,0 g, natrijev disulfid (natrijev metabisulfid), bezvodni ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) 1,0 g, željezo (III) amonijev citrat ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{FeNO}_4$ ) 1,0 g, agar 15,0 g, voda 1 000 mL. Priprema: sve komponente otopljene su u vodi i sterilizirane 15 minuta u autoklavu postavljenom na 121 °C, a pH je nakon sterilizacije podešen na  $7,6 \pm 0,2$  na 25 °C. Medij je čuvan na 5 °C, a prije uporabe otopljen i ohlađen na 44 °C – 47 °C.

### 3.1.5 Uređaji

- mikrobiološki zaštitni kabinet, MC 12-2 (Iskra pio d.o.o., Šentjernej, Slovenija)
- centrifuga, SL 8R (Thermo Fisher Scientific GmbH, Osterode am Harz, Njemačka)
- centrifuga, VWR Micro Star 17R (VWR International bvba, Leuven, Njemačka)
- centrifuga, 5804 (Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka)
- analitička vaga, BP2100S Basic Plus Balance (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- analitička vaga, V04130-3E0 Voyager (Ohaus, Parsippany, SAD)
- vaga/dilumat Start/Expert (bioMérieux S.A., Saint-Vulbas, Francuska)
- homogenizator AES Smasher blender (AES/bioMérieux, Saint-Vulbas, Francuska)
- vibracijska miješalica, Vortex 2 (IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Njemačka)
- vibracijska miješalica, Genie Disruption/Cell Disruptor SI-D258 (Scientific Industries, Inc., Bohemia, SAD)
- termalna vibracijska miješalica, Thermal Shake Lite (VWR International bvba, Shanghai, Kina)
- digitalna suha kupelj, 113002-2 (Boekel, Pennsylvania, SAD)
- zamrzivač, LFF 660 (Arctiko, Esbjerg, Danska)
- hladnjak, DTP140GA (SMEG, Guastalla, Italija)
- real-time PCR, PikoReal 24 (Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finska)
- vodena kupelj (Grant Instruments Ltd, Royston, UK)
- inkubator ST 1/1 C Smart (Pol-Eko aparatura SP.J., Wodzisław Śląski, Poljska)

- inkubator Pol-Eko ST1200CM (Pol-Eko aparatura SP.J., Wodzisław Śląski, Poljska)
- inkubator bd 53 30-40 (Binder, Tuttlingen, Njemačka)
- mikroskop BX50F-3 (Olympus, Tokyo, Japan)
- pH metar, WTW inoLAB pH LEVEL 2P (WTW GmbH & Co. KG, Weilheim, Njemačka)
- uređaj za mjerenje aktiviteta vode AquaLab LITE (Decagon, Pullman, SAD).

### 3.1.6 Pribor

- automatske pipete 0,5 – 10 µL, 10 – 100 µL, 100 – 1 000 µL (Brand GmbH + CO. KG, Wertheim, Njemačka)
- nastavci za automatske pipete 0,5 – 10 µL, 10 – 100 µL, 100 – 1 000 µL (Brand GmbH + CO. KG, Wertheim, Njemačka)
- graduirane pipete (1 i 10 mL)
- plastična posuda za odlaganje otpadnog i infektivnog materijala
- sterilni brisevi – plastični štapići s vrhom od najlonskih vlakana (Citotest Labware Manufacturing Co Ltd, Haimen City, Kina)
- laboratorijske čaše
- laboratorijski stalci
- mikrobiološke epruvete (16 × 160 mm, 18 × 180 mm)
- Eppendorf epruvete (1,5 i 2 mL)
- prijenosni hladnjaci s ledenim ulošcima
- držač magnetnih kuglica
- Petrijeve zdjelice (Ø 90 mm)
- mikrobiološke ušice
- PVC posuda za odlaganje infektivnog materijala
- mikrobiološke epruvete (15 mL).

### 3.1.7 Kemikalije i reagensi

Sve korištene kemikalije bile su visoke analitičke čistoće:

- etanol 99,9 % (Scharlab S.L., Sentmenat, Barcelona, Španjolska)
- etanol 96 % (Alkaloid AD, Skopje, Sjeverna Makedonija)

- etanol 70 – 75 % (HSH Chemie d.o.o., Škofja Loka, Slovenija)
- izopropanol (J.T. Baker, Deventer, Nizozemska)
- voda za molekularnu biologiju (Eurofins GeneScan Technologies GmbH, Freiburg, Njemačka)
- polietilen glikol (PEG) 8 000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- natrijev klorid (J.T. Baker, Phillipsburg, NY, SAD)
- kalijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- dinatrijev hidrogenfosfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kalijev dihidrogenfosfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- glicin (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- natrijev hidroksid ( $\geq 10$  mol/l) (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- klorovodična kiselina ( $\geq 5$  mol/l) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- oksidaza reagens (bioMérieux, Saint-Vulbas, Francuska).

### 3.1.8 Sastav i priprema reagensa i pufera

#### a) Tris/glicin/govedi ekstrakt (TGBE) pufer

- tris baza [tris(hidroksimetil)aminometan]  $12,1 \pm 0,2$  g, glicin  $3,8 \pm 0,1$  g, govedí ekstrakt u prahu  $10 \pm 1,0$  g, voda  $1\ 000 \pm 10$  mL. Priprema: svi sastojci otopljeni su u vodi, a pH podešen na  $9,5 \pm 0,2$  pri  $25$  °C. Pufer je steriliziran u autoklavu pri  $121$  °C kroz 15 minuta. Čuvan je na temperaturi od  $5$  °C.

#### b) Fosfatno puferirana fiziološka otopina (PBS)

- natrijev klorid  $8,0 \pm 0,1$  g, kalijev klorid  $0,2 \pm 0,01$  g, dinatrijev hidrogenfosfat  $1,15 \pm 0,01$  g, kalijev dihidrogenfosfat  $0,2 \pm 0,01$  g, voda  $1\ 000 \pm 10$  mL. Priprema: svi sastojci otopljeni su u vodi, pH je podešen na  $7,3 \pm 0,2$  na  $25$  °C. Otopina je sterilizirana u autoklavu pri  $121$  °C kroz 15 minuta te je čuvana na temperaturi od  $5$  °C.

#### c) $5 \times$ PEG/NaCl otopina (500 g/l PEG 8 000, 1,5 mol/l NaCl)

- polietilen glikol (PEG) 8 000  $500 \pm 2$  g, natrijev klorid (NaCl)  $87 \pm 1$  g, voda  $1\ 000 \pm 10$  mL. Priprema: krutine su otopljene u  $450 \pm 5$  mL vode, uz lagano zagrijavanje. Volumen je podešen vodom na  $1\ 000 \pm 10$  mL i sve je dobro promiješano. Otopina je sterilizirana u autoklavu pri  $121$  °C kroz 15 minuta, a čuvana je na sobnoj temperaturi.

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Protokoli za izolaciju nukleinskih kiselina

Za sve izabrane ispitane kitove korišteni su protokoli propisani od strane proizvođača te su u pokusnom dijelu optimiranja kitova predloženi alternativni protokoli prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2.

#### 3.2.1.1 Absolutely RNA Miniprep kit za izolaciju nukleinskih kiselina

Komponente dobivene u kitu za izolaciju nukleinskih kiselina „Absolutely RNA Miniprep“ prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Popis komponenti kita za izolaciju nukleinskih kiselina „Absolutely RNA Miniprep“

<b>Komponenta</b>	<b>Količina</b>
Pufer za lizu	35 mL
β-Mercaptoethanol (β-ME) (14,2 M)	0,3 mL
RNaza-slobodna DNaze I (liofilizirana)	2 600 U
DNaza pufer za rekonstituciju	0,3 mL
DNaza pufer za digestiju	2 × 1,5 mL
Pufer za ispiranje s visokim udjelom soli (1.67 ×)	24 mL
Pufer za ispiranje s niskim udjelom soli (5 ×)	17 mL
Pufer za eluciju	12 mL
Predfilter epruvete za centrifugu (plave) i 2 mL epruvete	50 kom
RNA vezujuće epruvete za centrifugu i 2 mL epruvete	50 kom
1,5 mL epruvete	50 kom

Ovaj izolacijski kit koristi epruvete za centrifugiranje s matricom koja u prisutnosti kaotropne soli veže RNK, dok se kroz niz koraka ispiranja uklanjaju kontaminanti. Pufer za liziranje sadrži gvanidin tiocijanat, jaki proteinski denaturant za liziranje stanica i sprječavanje razgradnje RNK pomoću ribonukleaza (RNaza). Nakon stanične lize, uzorak se prethodno filtrira u epruveti za centrifugiranje kako bi se uklonile čestice i smanjila količina DNK, a nakon čega se filtrat prenosi u epruvetu za vezanje RNK. Tretman s puferom za ispiranje s niskim sadržajem soli i digestijom s DNazom uklanja preostalu DNK. Kroz niz slijedećih ispiranja uklanja se



DNazu i druge proteine. Visoko čista RNK eluira se iz matrice epruvete za centrifugiranje s malim volumenom pufera niske ionske snage i ispušta u epruvetu za mikrocentrifugu, nakon čega je dobivena visoko čista RNK koja je idealna za konvencionalni RT-PCR i kvantitativni RT-PCR u stvarnom vremenu (Agilent, 2020).

#### 3.2.1.1.1 Priprema reagensa DNaza I bez RNaze

Liofilizirana DNaza I bez RNaze rekonstituirana je dodavanjem 290  $\mu$ L pufera za rekonstituciju DNaze u bočicu. Pažljivo i temeljito sadržaj je promiješan kako bi se osiguralo da se sav prašak (uključujući i prašak na čepu) otopi u konačnu otopinu, s obzirom na to da je DNaza I iznimno osjetljiva na denaturaciju. Rekonstituirana DNaza I bez RNaze čuvana je na  $-20$  °C.

#### 3.2.1.1.2 Priprema pufera za ispiranje s visokim udjelom soli

Pufer za ispiranje s visokim udjelom soli ( $1,67 \times$ ) pripremljen je dodavanjem 16 mL 99,9 % etanola u bočicu pufera. Nakon dodavanja etanola, bočica je prikladno označena i čuvana na sobnoj temperaturi.

#### 3.2.1.1.3 Priprema pufera za ispiranje s niskim udjelom soli

Pufer za ispiranje s niskim udjelom soli ( $5 \times$ ) pripremljen je dodavanjem 68 mL 99,9 % etanola u bočicu pufera. Nakon dodavanja etanola, bočica je prikladno označena i čuvana na sobnoj temperaturi.

#### 3.2.1.1.4 Priprema 70 % etanola

Razrjeđenjem 95 % etanola s vodom pripremljen je 70 % (v/v) etanol. Za pripremu 100 mL 70 % etanola dodano je 26 mL vode u 74 mL 95 % etanola kako bi se dobio konačni volumen od 100 mL.

#### 3.2.1.1.5 $\beta$ -Merkaptoetanol ( $\beta$ -ME)

Nakon otvaranja  $\beta$ -ME čuvan je na 4 °C.

#### 3.2.1.1.6 Protokol za izolaciju RNK

- 1) U pripremljeni uzorak volumena 140  $\mu$ L, dobiven od 10  $\mu$ L MNV standarda i 130  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O te serije dodatnih 10-strukih razrjeđenja, dodana je pripremljena mješavina pufera za liziranje i  $\beta$ -ME (200  $\mu$ L pufera za liziranje/1,4  $\mu$ L  $\beta$ -ME).
- 2) Pripremljena mješavina uzorka i otopine pufera za liziranje i  $\beta$ -ME prebačena je u predfilter epruvetu za centrifugu koja je postavljena u epruvetu od 2 mL, nakon čega je zatvoren poklopac epruvete.
- 3) Epruvete su centrifugirane 5 minuta na 14 000 o/min.
- 4) Predfilter epruveta za centrifugu izvađena je iz epruvete od 2 mL i bačena, a filtrat je zadržan. Kako bi se smanjila mogućnost curenja tijekom daljnjeg miješanja, poklopac epruvete je dobro zatvoren.
- 5) Dodan je jednak volumen 70 % etanola u filtrat, nakon čega je epruveta izmiješana na vibro miješalici 5 sekundi, kako bi se filtrat i etanol temeljito izmiješali.
- 6) Mješavina je zatim prenesena u RNK vezujuće epruvete za centrifugu koje su postavljene u epruvete od 2 mL, nakon čega je dobro i pažljivo zatvoren poklopac epruvete kako bi se smanjila mogućnost curenja tijekom daljnjeg miješanja.
- 7) Epruvete su centrifugirane 45 sekundi na 14 000 o/min.
- 8) RNK vezujuća epruveta za centrifugu privremeno se izvadi, filtrat se baca te se nakon toga epruvetu ponovno vrati u epruvetu od 2 mL.
- 9) Za tretiranje DNaze proveden je preporučeni postupak:
  - a) Dodano je 600  $\mu$ L 1  $\times$  pufera za ispiranje s niskim udjelom soli, nakon čega je epruveta centrifugirana 45 sekundi na 14 000 o/min.
  - b) RNK vezujuća epruveta za centrifugu privremeno se izvadi, a filtrat se baca te se nakon toga epruveta ponovno vrati u epruvetu od 2 mL te su epruvete potom centrifugirane 2 minute na 14 000 o/min.
  - c) Laganim miješanjem pripremljena je otopina DNaze, miješanjem 50  $\mu$ L pufera za digestiju DNaze s 5  $\mu$ L rekonstituirane DNaze I bez RNaze.
  - d) Otopina DNaze dodana je izravno na matricu unutar epruvete za centrifugiranje.
  - e) Uzorak je inkubiran 15 minuta na 37 °C.

- 10) Dodano je 600  $\mu\text{L}$  1  $\times$  pufera za ispiranje s visokim udjelom soli, nakon čega je epruveta centrifugirana 45 sekundi na 14 000 o/min.
- 11) RNK vezujuća epruveta za centrifugu privremeno se izvadi, filtrat se baca te se nakon toga RNK vezujuća epruveta ponovno vraća u epruvetu od 2 mL.
- 12) Dodano je 600  $\mu\text{L}$  1  $\times$  pufera za ispiranje s niskim udjelom soli, nakon čega su epruvete centrifugirane 45 sekundi na 14 000 o/min.
- 13) RNK vezujuća epruveta za centrifugu privremeno se izvadi, filtrat se baca te se nakon toga RNK vezujuća epruveta ponovno vraća u epruvetu od 2 mL.
- 14) Dodano je 300  $\mu\text{L}$  1  $\times$  pufera za ispiranje s niskim udjelom soli, nakon čega su epruvete centrifugirane 45 sekundi na 14 000 o/min kako bi se matrica osušila.
- 15) Epruveta za centrifugiranje premještena je u epruvetu od 1,5 mL, a epruveta od 2 mL je bačena.
- 16) Dodano je 60  $\mu\text{L}$  pufera za eluciju, zagrijanog na 60 °C, izravno na središte matrice unutar epruvete za centrifugiranje koja je zatim dobro zatvorena. Epruvete su inkubirane 2 minute na sobnoj temperaturi, a potom su centrifugirane 2 minute na 14 000 o/min.
- 17) Pročišćena RNK nalazi se u puferu za eluciju u 1,5 mL epruveti. RNK je pohranjena na -20 °C i naknadno ispitana na RT-PCR uređaju.

### 3.2.1.2 RealLine Extraction 100 kit za izolaciju nukleinskih kiselina

Komponente dobivene u kitu za izolaciju nukleinskih kiselina „RealLine Extraction 100“ prikazane su u tablici 4.

Tablica 4. Popis komponenti kita za izolaciju nukleinskih kiselina „RealLine Extraction 100“

<b>Komponenta</b>	<b>Količina</b>
Pufer za liziranje	8 $\times$ 4 mL
Suspenzija magnetskih čestica	1 $\times$ 1 mL
Otopina za taloženje DNK/RNK	4 $\times$ 12 mL
Otopina za ispiranje br. 1	4 $\times$ 8 mL
Otopina za ispiranje br. 2	4 $\times$ 5 mL
Diluent za uzorke	12 $\times$ 3 mL

#### 3.2.1.2.1 Priprema pufera za liziranje

Pufer za liziranje pripremljen je zagrijavanjem na 55 °C nakon čega je dobro izmiješan.

#### 3.2.1.2.2 Priprema mješavine pufera za liziranje i suspenzije magnetskih čestica

Mješavina pufera za liziranje i suspenzije magnetskih čestica pripremljena je tako što je bočica suspenzije magnetskih čestica dobro izmiješana do stanja homogene suspenzije, nakon čega je 80 µL suspenzije dodano u bočicu s puferom za liziranje te opet temeljito promiješano.

#### 3.2.1.2.3 Protokol za izolaciju RNK

- 1) Epruvete su pripremljene tako što je u njih dodano 140 µL uzorka, pripremljenog od 10 µL MNV standarda i 130 µL ddH<sub>2</sub>O te serije uzorka dodatnih 10-strukih razrjeđenja, a zatim 300 µL pripremljene mješavine pufera za liziranje i suspenzije magnetskih čestica. Epruvete su homogenizirane 10 – 15 sekundi, stavljene u termalnu vibracijsku miješalicu i inkubirane 10 minuta na 65 °C i 1 300 okretaja u minuti. Poslije inkubacije kratko su vorteksirane kako bi se pokupile preostale kapljice.
- 2) U svaku epruvetu dodano je 400 µL otopine za taloženje nukleinskih kiselina.
- 3) Epruvete su homogenizirane 10 – 15 sekundi, potom ostavljene 4 minute na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirane na 13 000 okretaja kroz 5 minuta, također na sobnoj temperaturi.
- 4) Bez miješanja peleta, epruvete su pažljivo stavljene u magnetni stalak, nakon čega je pažljivo uklonjen supernatant, pritom pazeći da pelet ostane netaknut.
- 5) U svaku epruvetu dodano je 500 µL otopine za ispiranje br. 1, nakon čega su epruvete vorteksirane 10 – 15 sekundi te centrifugirane na 13 000 okretaja kroz 5 minuta.
- 6) Bez miješanja peleta epruvete su ponovno pažljivo vraćene u magnetni stalak, nakon čega je pažljivo uklonjen supernatant pazeći da pelet ostane netaknut.
- 7) U svaku epruvetu dodano je 300 µL otopine za ispiranje br. 2, zatim su epruvete vorteksirane 10 – 15 sekundi te centrifugirane na 13 000 okretaja kroz 5 minuta.
- 8) Bez miješanja peleta, epruvete su ponovno pažljivo vraćene u magnetni stalak, nakon čega je pažljivo uklonjen supernatant pazeći da pelet ostane netaknut.

- 9) Pelet je dodatno osušen u otvorenim epruvetama kroz 2 – 3 minute na sobnoj temperaturi.
- 10) Dodano je 200  $\mu$ L diluenta za uzorke, nakon čega je pelet dobro i pažljivo resuspendiran. Zatim su epruvete stavljene u termalnu vibracijsku miješalicu i inkubirane 10 minuta na 56 °C i 1 300 okretaja u minuti. Nakon inkubacije centrifugirane su 1 minutu na 13 000 okretaja u minuti.
- 11) Uzorci su odmah ispitani na RT-PCR uređaju.

### 3.2.1.3 VIRSeek RNAExtractor kit za izolaciju nukleinskih kiselina

Komponente dobivene u kitu za izolaciju nukleinskih kiselina „VIRSeek RNAExtractor“ prikazane su u tablici 5.

Tablica 5. Popis komponenti kita za izolaciju nukleinskih kiselina „VIRSeek RNAExtractor“

<b>Komponenta</b>	<b>Količina</b>
Magnetne kuglice	1 mL
Liofiliziran nosači RNK	300 $\mu$ g
Pufer za liziranje	28 mL
WB1, koncentrat pufera za ispiranje	25 mL
WB2, koncentrat pufera za ispiranje	16,5 mL
WB3, koncentrat pufera za ispiranje	21 mL
Pufer za eluciju	2 mL
Voda bez RNaze	1 mL

#### 3.2.1.3.1 Priprema pufera za ispiranje WB1

U bočicu koja sadrži koncentrat pufera za ispiranje WB1 dodano je 25 mL apsolutnog etanola ( $\geq 96$  %), nakon čega je sadržaj dobro homogeniziran, a bočica je označena i čuvana na sobnoj temperaturi.

#### 3.2.1.3.2 Priprema pufera za ispiranje WB2

U bočicu koja sadrži koncentrat pufera za ispiranje WB2 dodano je 38,5 mL apsolutnog etanola ( $\geq 96$  %), nakon čega je sadržaj dobro homogeniziran, a bočica je označena i čuvana na sobnoj temperaturi.

#### 3.2.1.3.3 Priprema pufera za ispiranje WB3

U bočicu koja sadrži koncentrat pufera za ispiranje WB3 dodano je 44 mL apsolutnog etanola ( $\geq 96\%$ ), potom je sadržaj dobro homogeniziran, a bočica je označena i čuvana na sobnoj temperaturi.

#### 3.2.1.3.4 Otopina nosača (eng. carrier) RNK

U staklenu posudu koja sadrži liofilizirane nosače RNK dodano je 600  $\mu\text{L}$  vode bez RNaze, nakon čega je otopina razmjerno razdijeljena u više manjih epruveta i pohranjena na  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 3.2.1.3.5 Dodavanje nosača RNK u pufer za liziranje

Konačni pufer za liziranje (koji sadrži nosače RNK) uvijek se pripremio neposredno prije izolacije. Volumen pufera za liziranje i nosača RNK izračunat je prema sljedećim formulama:

$$V_L = n \times 750 \mu\text{L}$$

$$V_C = n \times 5 \mu\text{L}$$

n: broj uzoraka koji će se obraditi

$V_L$  - Volumen pufera za liziranje

$V_C$  - Volumen otopine nosača RNK

#### 3.2.1.3.6 Protokol za izolaciju RNK

##### 1) Liziranje uzorka

- a) U reakcijsku epruvetu od 2 mL otpipetirano je 750  $\mu\text{L}$  svježe pripremljenog pufera za liziranje koji sadrži nosače RNK.
- b) U reakcijsku epruvetu od 2 mL koja sadrži konačnu mješavinu za liziranje dodan je volumen uzorka od 140  $\mu\text{L}$  koji je pripremljen od 10  $\mu\text{L}$  MNV standarda i 130  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O te je sve pipetiranjem dobro promiješano.
- c) Reakcijska epruveta inkubirana je 10 minuta na termalnoj vibracijskoj miješalici (300 o/min na temperaturi od  $50\text{ }^\circ\text{C}$ ).

- 2) Vežanje RNK
  - a) Termalna vibracijska miješalica ohlađena je na sobnu temperaturu.
  - b) U reakcijsku epruvetu dodan je jednak volumen etanola ( $\geq 96\%$ ).
  - c) Prije pipetiranja magnetnih kuglica, suspenzija je dobro homogenizirana kako bi se kuglice ponovno resuspendirale.
  - d) U reakcijsku epruvetu dodano je 10  $\mu\text{L}$  suspenzije koja sadrži magnetske kuglice, pazite da se kuglice dobro resuspendiraju pipetiranjem gore-dolje (8 – 10  $\times$ ).
  - e) Reakcijska epruveta inkubirana je 10 minuta na termalnoj vibracijskoj miješalici (800 o/min na sobnoj temperaturi).
- 3) Prvi korak pranja
  - a) Epruveta je postavljena na magnetni stalak kako bi se magnetske kuglice vezale i ostavljena je na magnetnom stalku sve dok smjesa nije postala bistra (1 – 2 minute).
  - b) Nakon potpunog hvatanja kuglica, supernatant je izdvojen i odstranjen iz epruvete.
  - c) Epruveta je izvađena iz magnetnog stalka.
  - d) Dodano je 900  $\mu\text{L}$  pripremljenog pufera za ispiranje WB1.
  - e) Kuglice su zatim isprane opetovanim pipetiranjem gore - dolje (8 – 10  $\times$ ).
- 4) Drugi korak pranja
  - a) Epruveta je postavljena na magnetni stalak kako bi se magnetske kuglice vezale i ostavljena je na magnetnom stalku sve dok smjesa nije postala bistra (1 – 2 minute).
  - b) Nakon potpunog hvatanja kuglica, supernatant je izdvojen i odstranjen iz epruvete.
  - c) Epruveta je izvađena iz magnetnog stalka.
  - d) Dodano je 1 000  $\mu\text{L}$  pripremljenog pufera za ispiranje WB2.
  - e) Kuglice su zatim isprane, opetovanim pipetiranjem gore-dolje (8 – 10  $\times$ ).
  - f) Suspenzija je prebačena u novu epruvetu od 1,5 mL.
- 5) Treći korak pranja
  - a) Epruveta je postavljena na magnetni stalak kako bi se magnetske kuglice vezale i ostavljena je na magnetnom stalku sve dok smjesa nije postala bistra (1 – 2 minute).
  - b) Nakon potpunog hvatanja kuglica, supernatant je izdvojen i odstranjen iz epruvete.
  - c) Epruveta je izvađena iz magnetnog stalka.
  - d) Dodano je 1 000  $\mu\text{L}$  pripremljenog pufera za ispiranje WB3.
  - e) Kuglice su zatim isprane opetovanim pipetiranjem gore-dolje (8 – 10  $\times$ ), nakon čega su epruvete odmah postavljene na magnetni stalak kako bi se magnetske kuglice vezale.

6) Sušenje kuglica

- a) Termalna vibracijska miješalica zagrijana je na 40 °C (blok modul za 1,5 mL epruvete).
- b) Epruveta je ostavljena na magnetnom stalku sve dok smjesa nije postala bistra (1 – 2 minute).
- c) Nakon potpunog hvatanja kuglica, supernatant je izdvojen i odstranjen iz epruvete.
- d) Iz epruvete je uklonjena sva preostala tekućina.
- e) Epruvete su ostavljene na magnetskom stalku (s otvorenim poklopcem) na sobnoj temperaturi 5 minuta, kako bi se magnetne kuglice osušile. Sušenje je nastavljeno još 5 minuta na 40 °C na termo bloku kako bi se uklonio preostali etanol.

7) RNK elucija

- a) Termalna vibracijska miješalica zagrijana je na 60 °C (blok modul za 1,5 mL epruvete).
- b) U epruvetu je dodano 100 µL pufera za eluciju unaprijed zagrijanog na 60 °C, nakon čega su kuglice opetovanim pipetiranjem gore-dolje resuspendirane u otopini.
- c) Epruvete su inkubirane 5 minuta na termalnoj vibracijskoj miješalici na 1 300 o/min, pri temperaturi od 60 °C.
- d) Epruvete su nakon inkubacije postavljene na magnetni stalak sve dok smjesa nije postala bistra (1 – 2 minute).
- e) Supernatant koji sadrži virusnu RNK prebačen je u novu reakcijsku epruvetu.
- f) Izolirana RNK je pohranjena na -20 °C i naknadno ispitana na RT-PCR uređaju.

#### 3.2.1.4 QIAamp Viral RNA Mini kit za izolaciju nukleinskih kiselina

Komponente dobivene u kitu za izolaciju nukleinskih kiselina „QIAamp Viral RNA Mini kit“ prikazane su u tablici 6.



Tablica 6. Popis komponenti kita za izolaciju nukleinskih kiselina „QIAamp Viral RNA Mini kit“

<b>Komponenta</b>	<b>Količina</b>
QIAamp Mini Spin epruvete	250 kom
Epruvete za sakupljanje (2 mL)	750 kom
AVL pufer	155 mL
AW1 pufer (koncentrat)	98 mL
AW2 pufer (koncentrat)	66 mL
AVE pufer	20 mL
Nosač RNK	1550 $\mu$ L

#### 3.2.1.4.1 Priprema AVE pufera

AVE pufer dodan je u epruvetu koja sadrži liofilizirane nosače RNK kako bi se dobila otopina od 1  $\mu$ g/ $\mu$ L (1 550  $\mu$ L pufera AVE na 1 550  $\mu$ g liofiliziranih nosača RNK). Nakon što su nosači RNK dobro otopljeni, podijeljeni su u alikvote odgovarajuće veličine i pohranjeni na  $-20$  °C.

#### 3.2.1.4.2 Priprema mješavine otopljenih nosača RNK i AVL pufera

AVL pufer inkubiran je na 80 °C dok se talog nije otopio. Prema tablici 7. određen je volumen mješavine AVL pufera i nosača RNK potreban po seriji uzoraka određivanjem broja uzoraka koji će se istovremeno obraditi. Okretanjem epruvete 10 puta, mješavina je lagano promiješana kako bi se izbjeglo stvaranje pjene, a svježe je pripravljena neposredno prije provedbe protokola izolacije.

Tablica 7. Volumeni AVL pufera i mješavine nosača RNK i AVE pufera potrebni za QIAamp Viral RNA Mini proceduru

<b>Broj uzoraka</b>	<b>AVL pufer (mL)</b>	<b>Nosači RNK-AVE (μL)</b>	<b>Broj uzoraka</b>	<b>AVL pufer (mL)</b>	<b>Nosači RNK-AVE (μL)</b>
1	0.56	5.6	13	7.28	72.8
2	1.12	11.2	14	7.84	78.4
3	1.68	16.8	15	8.4	84
4	2.24	22.4	16	8.96	89.6
5	2.8	28	17	9.52	95.2
6	3.36	33.6	18	10.08	100.8
7	3.92	39.2	19	10.64	106.4
8	4.48	44.8	20	11.2	112
9	5.04	50.4	21	11.76	117.6
10	5.6	56	22	12.32	123.2
11	6.16	61.6	23	12.88	128.8
12	6.72	67.2	24	13.44	134.4

#### 3.2.1.4.3 Priprema AW1 pufera

Pufer AW1 isporučuje se kao koncentrat. Prije prve uporabe dodana je odgovarajuća količina etanola (96 – 100 %) kako je naznačeno na bočici i u uputstvima proizvođača. U 98 mL AW1 koncentrata dodano je 130 mL etanola, a nakon pripreme pufer je stabilan jednu godinu kada se čuva zatvoren na sobnoj temperaturi, ali samo do datuma isteka valjanosti kita.

#### 3.2.1.4.4 Priprema AW2 pufera

Pufer AW2 isporučuje se kao koncentrat. Prije prve uporabe dodana je odgovarajuća količina etanola (96 – 100 %) kako je naznačeno na bočici i u uputstvima proizvođača. U 66 mL AW2 koncentrata dodano je 160 mL etanola, a nakon pripreme pufer je stabilan jednu godinu kada se čuva zatvoren na sobnoj temperaturi, također samo do datuma isteka valjanosti kita.

#### 3.2.1.4.5 Protokol za izolaciju RNK

Prije početka provedbe izolacijskog protokola uzorci i AVE pufer temperirani su na sobnu temperaturu.

- 1) Otpipetirano je 560  $\mu\text{L}$  pripremljene mješavine AVL pufera i nosača RNK u epruvetu od 1,5 mL.
- 2) Zatim je u epruvetu od 1,5 mL, koja sadržava mješavinu AVL pufera i nosača RNK, dodano 140  $\mu\text{L}$  uzorka pripremljenog od 10  $\mu\text{L}$  MNV standarda i 130  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O te je sve dobro promiješano pulsним vorteksiranjem 15 sekundi.
- 3) Epruvete su inkubirane na sobnoj temperaturi 10 minuta.
- 4) Nakon inkubacije epruvete su kratko centrifugirane na 1 000 o/min kako bi se uklonile kapljice s unutarnje strane poklopca.
- 5) Uzorcima je dodano 560  $\mu\text{L}$  etanola (96 – 100 %), a potom su epruvete izmiješane pulsним vorteksiranjem 15 sekundi. Nakon miješanja, epruvete su kratko centrifugirane na 1 000 o/min kako bi se uklonile kapljice iz unutrašnjosti poklopca.
- 6) 630  $\mu\text{L}$  otopine iz koraka 5 pažljivo je preneseno na QIAamp Mini kolonu (epruvetu za sakupljanje od 2 mL) bez doticanja ruba. Epruveta je dobro zatvorena i centrifugirana 1 minutu na 8 000 o/min. Nakon centrifugiranja QIAamp Mini kolona postavljena je u čistu epruvetu za prikupljanje od 2 mL, a epruveta koja sadrži filtrat je bačena.
- 7) QIAamp Mini kolona pažljivo je otvorena te je ponovljen korak 6.
- 8) Nakon ponovljenog koraka 6, dodano je 500  $\mu\text{L}$  AW1 pufera. Epruveta je dobro zatvorena i centrifugirana 1 minutu na 8 000 o/min. Nakon centrifugiranja QIAamp Mini kolona je postavljena u čistu epruvetu za prikupljanje od 2 mL, a epruveta koja sadrži filtrat je bačena.
- 9) QIAamp Mini kolona pažljivo je otvorena, a zatim je dodano 500  $\mu\text{L}$  AW2 pufera. Epruveta je dobro zatvorena i centrifugirana 3 minute na 14 000 o/min.
- 10) QIAamp Mini kolona prebačena je u čistu epruvetu od 1,5 mL. Korištena epruveta za sakupljanje koja sadrži filtrat je bačena. QIAamp Mini kolona pažljivo je otvorena, a zatim je dodano 40  $\mu\text{L}$  AVE pufera temperiranog na sobnu temperaturu. Epruveta je zatvorena i inkubirana na sobnoj temperaturi 1 minutu.
- 11) Nakon inkubiranja na sobnoj temperaturi, epruvete su centrifugirane 1 minutu 8 000 o/min. Zatim je QIAamp Mini kolona ponovno pažljivo otvorena, dodano je još 40  $\mu\text{L}$  AVE pufera te je epruveta ponovno zatvorena i 1 minutu inkubirana na sobnoj

temperaturi, a zatim 1 minutu centrifugirana na 8 000 o/min. Virusna RNK čuvana je na -20 °C.

### 3.2.1.5 Protokol za pripremu uzoraka hrane

Europski odbor za standardizaciju (CEN/TC275/WG6/TAG4) razvijao je standardne metode za otkrivanje NoV i HAV u hrani koje su 2013. godine bile objavljene kao Tehnička specifikacija CEN ISO/TS 15216 (TS) (HRS CEN ISO/TS 15216-2, 2013). Bitno je napomenuti da Tehnička specifikacija nije uključivala metodu za ispitivanje hrane spremne za konzumaciju (Greening i sur., 2016). Kasnije je taj dokument povučen, a objavljena je revidirana verzija u formi norme EN ISO 15216-2:2019 (CEN i ISO). Navedena norma prihvaćena je kao HRN EN ISO 15216-2:2019 Mikrobiologija u lancu hrane -- Horizontalna metoda za određivanje virusa hepatitisa A i norovirusa upotrebom RT-PCR u stvarnom vremenu -- 2. dio: Metoda dokazivanja (ISO 15216-2:2019; EN ISO 15216-2:2019) (HRN EN ISO 15216-2:, 2019). Ovaj dokument precizno je opisao metodu za detekciju virusa hepatitisa A (HAV) i norovirusa genogrupe I (GI) i II (GII) iz ispitnih uzoraka prehrambenih proizvoda (mekog voća, lisnatog bilja, stabljika i gomoljastog povrća, flaširane vode i školjkaša) ili površina koristeći RT-PCR u stvarnom vremenu. Također je važno napomenuti da ova metoda nije validirana za detekciju ciljnih virusa u drugim prehrambenim proizvodima (uključujući višekomponentne prehrambene proizvode) ili bilo kojim drugim matricama, niti za detekciju drugih virusa u hrani, površinama ili drugim matricama. Iako metoda nije validirana za detekciju drugih virusa niti drugih matriksa poput gotovih jela, ista je korištena za provedbu ispitivanja uzoraka hrane prikupljenih na maloprodajnom tržištu.

#### 3.2.1.5.1 Protokol za pripremu uzoraka hrane i naknadnu izolaciju RNK

- 1) Gotova jela koja nisu bila homogena, usitnjena su na komade veličine otprilike 2,5 cm × 2,5 cm × 2,5 cm.
- 2) Testni uzorci odvagani su u količini od  $25 \pm 0,3$  grama i stavljeni u izdvojeni odjeljak za uzorke mrežaste filter vrećice od 400 mL.
- 3) U vrećicu koja je sadržavala uzorak dodano je  $40 \pm 1$  mL pufera tris/glicin/goveđi ekstrakt (TGBE).

- 4) Tako pripremljeni uzorci inkubirani su na sobnoj temperaturi, uz stalno miješanje na 60 okretaja po minuti tijekom 20 minuta.
- 5) Nakon inkubacije, eluat je iz filtriranog odjeljka vrećice prebačen u epruvetu za centrifugu. Kako bi se suspenzija razbistrila, epruveta sa suspenzijom centrifugirana je 30 minuta na 9 500 o/min pri 5 °C.
- 6) Poslije centrifugiranja, supernatant je pretočen u čistu epruvetu, provjerena je pH na 7,0 ± 0,5, a gdje je bilo potrebno pH vrijednost podešena je dodavanjem HCl ( $\geq 5$  mol/L) kiseline.
- 7) Zatim je dodano 0,25 volumena 5 × otopine PEG/NaCl te je sve zajedno dobro homogenizirano miješanjem 60 sekundi pa inkubirano s konstantnim miješanjem na približno 60 oscilacija po minuti, pri 5 °C tijekom 60 minuta.
- 8) Nakon inkubacije, epruvete su centrifugirane 30 minuta na 9 500 o/min pri 5 °C.
- 9) Iza centrifugiranja supernatant je dekantiran i odbačen, nakon čega je ponovljeno centrifugiranje na 9 500 o/min tijekom 5 minuta na 5 °C kako bi se dobio kompaktan talog, odnosno pelet.
- 10) Preostali supernatant je opet odbačen, a pelet je resuspendiran u 500 ± 10 µL fosfatno puferirane fiziološke otopine (PBS).

Eluat uzorka odmah je obrađen ili je pohranjen na 5 °C najviše 24 sata.

### 3.2.2 Modifikacija protokola na temelju upotrebe etanola/izopropanola

Osim izvorno propisanog protokola, ispitivanje je provedeno alternativnim protokolom u kojem se u koraku taloženja nukleinskih kiselina koristi etanol ili izopropanol. Modifikacija unutar kitova odvijala se nakon liziranja uzorka, odnosno napravljena je tijekom koraka vezanja RNK. Dodavanje jednakog volumena etanola u epruvetu s uzorkom zamijenjeno je dodavanjem jednakog volumena izopropanola. Nakon toga, postupak je isti kao pri propisanom protokolu proizvođača. Obrnuto, modifikacija unutar kita koji u navedenom koraku koristi izopropanol, napravljena je nakon liziranja uzorka tijekom koraka vezanja RNK, ali ovaj put dodavanjem jednakog volumena etanola u epruvetu s uzorkom, umjesto dodavanja jednakog volumena izopropanola.

U nastavku su jasno opisani postupci za pojedine kitove, odnosno u kojim koracima je provedena modifikacija protokola.

U slučaju Absolutely RNA Miniprep kita, za izolaciju nukleinskih kiselina u 5. koraku dodan je jednak volumen izopropanola u filtrat, nakon čega je epruveta izmiješana na vorteks miješalici 5 sekundi kako bi se filtrat i etanol temeljito izmiješali. Daljnja procedura bila je jednaka propisanom protokolu.

Kod RealLine Extraction 100 kita za izolaciju nukleinskih kiselina, u 2. koraku u svaku epruvetu dodano je 400  $\mu$ L etanola, a daljnja procedura odrađena je prema uputama proizvođača.

Što se tiče modifikacije u protokolu *VIRSeek* RNAExtractor kita za izolaciju nukleinskih kiselina, ona je provedena u točki b) 2. koraka, gdje je u reakcijsku epruvetu dodan jednak volumen izopropanola, a nakon čega je provedba nastavljena uobičajenim protokolom prema uputama proizvođača.

U slučaju posljednjeg kita za izolaciju nukleinskih kiselina, QIAamp Viral RNA Mini, modifikacija je napravljena u 5. koraku, točnije, uzorcima je dodano 560  $\mu$ L izopropanola, te je nakon toga protokol proveden prema uputama proizvođača.

### 3.2.3 Procjena najučinkovitijeg izolacijskog kita za provedbu ispitivanja

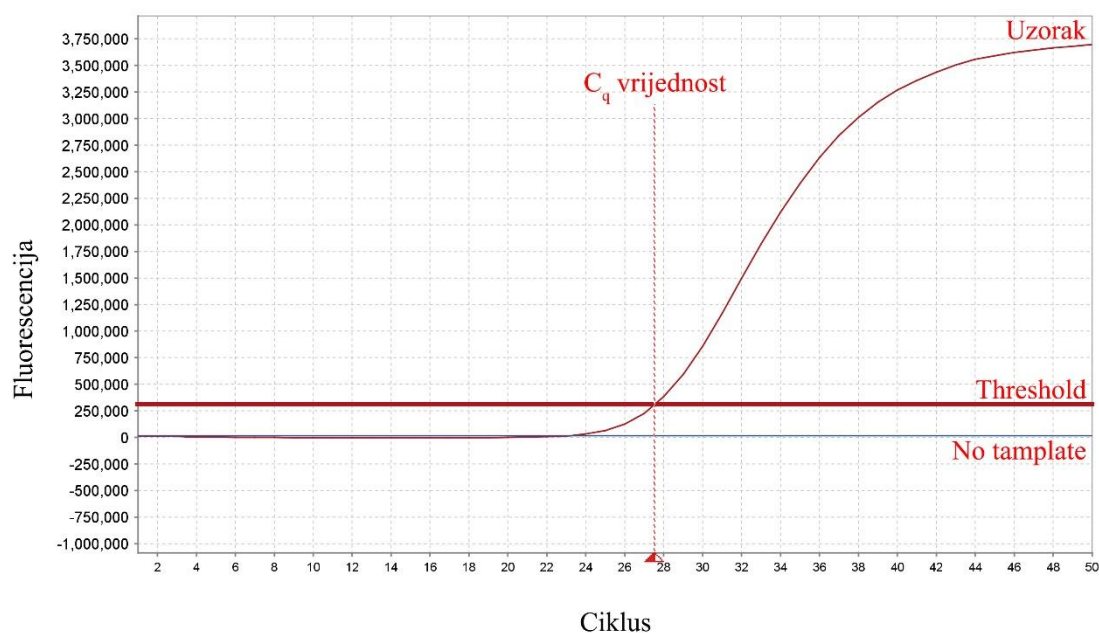
Procjena učinkovitosti kitova napravljena je tako što su pripremljeni testni uzorci u koje je stavljena jednaka količina standarda mišjeg norovirusa (MNV), točnije 10  $\mu$ L te serija dodatnih uzoraka s tri 10-struka razrjeđenja MNV standarda. Na taj način osigurana je jednaka početna količina standarda, uzimajući u obzir da prema izjavi proizvođača standard sadržava  $\approx 10^8$  kopija/mL. Poštujući originalni protokol prema uputama proizvođača i pomoću sva četiri izolacijska kita, izolirana je ciljana RNK iz svih pripremljenih uzoraka. Nadalje, iz istih uzoraka izolirana je ciljana RNK koristeći se alternativnim protokolom, također koristeći sva četiri izolacijska kita. Konačna usporedba i procjena napravljena je nakon što su dobiveni eluati testnih uzoraka ispitani putem real-time RT-PCR i to korištenjem *VIRSeek* Murine Norovirus detekcijskog kita (Eurofins GeneScan Technologies).

Termalni profil za *VIRSeek* Murine Norovirus detekcijski kit postavljen je kako slijedi: prvi korak, odnosno korak reverzne transkripcije - 20 minuta na 50 °C, a zatim drugi korak, aktivacija enzima i inaktivacija reverzne transkriptaze - 3 minute na 95 °C. Program PCR reakcije (denaturacija i sparivanje početnica) odvijao se u ukupno 45 ciklusa ponavljanja kako slijedi: denaturacija - 10 sekundi na 95 °C, sparivanje početnica (engl. annealing) i produljenje

lanca (engl. extension) - 60 sekundi na 60 °C. Fluorofor putem kojeg je detektirana ciljane genska sekvenca je Fluorescein - FAM (Eurofins, 2020b), a nalazi se na 530 nm valne duljine, točnije u rasponu ekscitacije 470 nm ± 15 nm i emisije 520 nm ± 15 nm. Rezultati su prikazani i procijenjeni putem softvera PikoReal™ 2.2.248.601 (Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finska).

Usporedba i procjena temeljena je na dobivenim  $C_t$  vrijednostima, koje se mogu definirati kao točke izvedene iz dijagrama PCR amplifikacije u stvarnom vremenu, a nazivaju se engl. threshold cycles tj. " $C_t$ ".

$C_t$  se definira i kao PCR ciklus u kojem signal reporterske boje prelazi postavljeni prag fluorescencije (engl. threshold) (slika 3). Alternativni termini koji imaju gotovo jednako značenje, a koriste se u literaturi su:  $C_p$  (engl. crossing point), TOP (engl. take-off point) i  $C_q$  (engl. quantification cycle) (Bustin i sur., 2009). Predstavljanje podataka u smislu određene  $C_t$  vrijednosti znači da je RT-PCR reakcija imala eksponencijalnu fazu amplifikacije. Važno je da eksponencijalnu fazu prati karakteristični oblik krivulje amplifikacije qPCR-a, a to je sigmoidalni oblik krivulje s relativno jasno određene tri vizualno različite prividne faze ili regije. Prema primjeru prikazanom na slici 3, početna fluorescencija reakcije na razini je takozvanog pozadinskog šuma, gdje se ne može otkriti gotovo nikakav signal fluorescencije. Zatim nastupa prva faza od 24. do 28. ciklusa, a naziva se eksponencijalna faza i za nju je karakterističan uzlazni trend od osnovne linije (engl. baseline). Slijedi druga faza sa snažnim linearnim trendom, od 28. i 38. ciklusa, gdje kroz nekoliko narednih ciklusa, kroz pristup završnoj fazi, dolazi do zasićenja te se signal amplifikacije smanjuje, a PCR krivulja prestaje rasti. Zaključno, treća, plato faza počinje u dijelu od 42. do 44. ciklusa nadalje, gdje je plato krivulje i signal amplifikacije stagnira. Krivulja amplifikacije koja izgleda kao na slici 3 općenito je znak "zdrave", dobre PCR reakcije (Zhang i sur., 2021; Brunstein, 2015).



Slika 3. Razina praga (engl. threshold) i vrijednost  $C_t$  na PCR krivulji amplifikacije sigmoidalnog oblika.

Kvalitativni testovi korišteni u ovom ispitivanju sadržavali su kontrolnu RNA (engl. In-Process Control; IPC) u svrhu kontrole kvalitete RT-PCR reakcije. Ako je vrijednost  $C_t$  kontrolne analize preniska ili previsoka dovodi se u pitanje valjanost ispitivanja. Mogući uzroci mogu biti povezani s kvalitetom i učinkovitosti izolacije, inhibicijom i tome slično, što bi moglo smanjiti osjetljivost testa ispod prihvatljive razine.

### 3.2.4 Potvrda primjenjivosti odabranog kita

Primjenjivost kita i metoda u cjelini potvrđena je u uvjetima koji jamče prisutnost virusa i to u dva neovisna koraka. Prvi korak provjere prikladnosti metode potvrđen je sudjelovanjem u ispitivanju sposobnosti (engl. Proficiency Testing; PT), nakon čega je u drugom koraku provjere metode i primjenjivosti provedeno pilot ispitivanje površinskih uzoraka ( $N = 84$ ). Pilot ispitivanje provedeno je na testnim uzorcima uzorkovanim u područjima karantene, a u kojima su boravile osobe bez simptoma ili sa slabo izraženim simptomima bolesti COVID-19. Unatoč predviđenim strogim mjerama ograničenja kretanja osobama sa simptomima bolesti COVID-



19, praksa je pokazala niz slučajeva u kojima se takve odredbe nisu poštovale, najčešće zbog neodgovornog ponašanja pojedinaca ili zbog poslovnih pritisaka te ustrajanja da se izbjegne veća ekonomska šteta od posljedičnog zaustavljanja određenih poslovnih procesa u proizvodnji i distribuciji hrane. Takvo stanje zaraženih osoba osnovna je pretpostavka za kontaminaciju prehrambenih artikala, kako u proizvodnji hrane, tako i u distribuciji i prometu s hranom. Najviše zanimanja i pitanja postavljalo se oko potencijalno kontaminirane ambalaže hrane u trgovačkim lancima o čemu je bilo riječi u mnogim istraživanjima (Kutter i sur., 2018; Herstein i sur., 2021; Han i sur., 2021; Ceylan i sur., 2020; Jalava, 2020).

### 3.2.5 Odabir i uzorkovanje uzoraka

Pregledom literature izabrane su različite kategorije hrane s koje su izuzeti uzorci briseva kao i uzorci hrane koja je spremna za konzumaciju, a za koje se smatra da mogu zastupati pojedine kategorije hrane. Pri kategorizaciji su u obzir uzeti uvjeti skladištenja, odnosno temperatura skladištenja te podrijetlo pakirane hrane. Konkretno, svi uzorci briseva i hrane uzeti su iz zona koje su u tzv. hladnom režimu, tj. pod temperaturama hlađenja (4 °C) i smrzavanja (-20 °C), a sve pod pretpostavkom temeljenoj na spomenutim studijama i dosadašnjim spoznajama da je najveća šansa da se virus pronađe u takvim uvjetima. Što se tiče podrijetla prehrambenih artikala prioritet je, u okviru dostupnosti, stavljen na pakiranja hrane pristigla iz najvećih žarišta u Europi u trenutku uzimanja uzoraka.

Sa svih površina uzoraka hrane ili površina pakiranja hrane (osim gotovih jela) uzorak brisa uzet je prema uputama ISO norme „Mikrobiologija prehrambenog lanca -- Horizontalna metoda za određivanje virusa hepatitisa A i norovirusa pomoću RT-PCR-a u stvarnom vremenu -- 2. dio: Metoda detekcije” (ISO 15216-2:2019; EN ISO 15216-2:2019) (HRN EN ISO 15216-2, 2019) i praktičnog vodiča SZO "Uzorkovanje površine od koronavirusne bolesti (COVID-19): Praktičan protokol "kako" za zdravstvene i javnozdravstvene stručnjake" (WHO, 2020e). Korištenje drvenih štapića s vatom strogo je izbjegavano, s obzirom na to da tako uzeti uzorci mogu rezultirati lažno negativnim rezultatima. Postupak uzorkovanja gotovih jela spremnih za konzumaciju proveden je prema uputama Nordijskog odbora za analizu hrane Procedura 12 – Vodič za uzorkovanje za analizu hrane (NMKL, 2014), Mikrobiologija prehrambenog lanca -- Tehnike uzorkovanja za mikrobiološku analizu uzoraka hrane i hrane za životinje (HRS CEN ISO/TS 17728, 2015) i Codex Alimentarius: Opće smjernice o uzorkovanju, CAC/GL 50-2004 (CAC, 2004).

### 3.2.6 Izolacija RNK iz izuzetih uzoraka

Prikupljeni uzorci obrađeni su metodom izolacije koja se pokazala najučinkovitijom te je iz njih izolirana RNK. Eluati dobiveni izolacijom korišteni su za daljnje ispitivanje prisutnosti ciljanih genskih sekvenci uz pomoć lančane reakcije polimeraze s reverznom transkripcijom u stvarnom vremenu (real-time RT-PCR).

### 3.2.7 Lančana reakcija polimeraze s reverznom transkripcijom u stvarnom vremenu (RT-PCR)

RT-PCR u stvarnom vremenu pomoću sonde za hidrolizu koristi kratku „Taqman“ DNK probu s fluorescentnom oznakom i prigušivačem fluorescencije pričvršćenim na 5', odnosno 3' krajevima. Kombinacija korištenih kemijskih komponenti pri ispitivanju osigurava da se s povećanjem količine amplificiranog analita sonda hidrolizira, a fluorescentni signal proporcionalno raste. Zbog niske razine virusa koji su prisutni u prehrambenim proizvodima ili na površinama i raznolikosti sojeva u ciljnim virusnim skupinama, odabir prikladnih reagensa, odnosno kitova iznimno je važan (ISO, 2019).

Reakcija RT-PCR u stvarnom vremenu započinje obrnutom transkripcijom (engl. Reverse Transcriptase; RT) virusne RNK u komplementarnu DNK (cDNK). Replikacija dobivene DNK ponavlja se kroz niz naknadnih ciklusa do količina na osnovu kojih se nedvojbeno može zaključiti da je tražena genska sekvenca uistinu prisutna u ispitivanom uzorku, odnosno do pojave amplikona - karakteristične sigmoidalne krivulje umnažanja. Za ovu studiju korišteni su kitovi za detekciju EuroFins Technologies, validirani i dizajnirani za ispitivanje uzoraka iz okoliša i površina hrane, a koji mogu detektirati gene proteina ovojnice (E-gen), RNK-ovisnu RNK polimerazu (RdRp-gen, unutar poliproteinskog gena Orf1ab), i gene nukleokapsidnog proteina (N1/N2-gen). Svi testovi izvedeni su u duplikatu.

U početnom koraku probira, izolirana RNK ispitana je pomoću specifičnih početnica nukleotidnih sekvenci SARS-CoV-2 na gen proteina ovojnice (E-gen) prisutan u koronavirusima povezanim sa SARS-om i MERS-om korištenjem detekcijskog kita *VIRSeek* SARS-CoV-2 Screen kit (Eurofins GeneScan Technologies). Osjetljivost kita potvrđena je analizom procjene granice detekcije (engl. Limit of Detection; LOD) s RNK izoliranom iz humanog uzorka oboljelog pacijenta, kvantificiranom ddPCR-om (engl. Digital Droplet PCR), dok se LOD definira kao koncentracija za koju najmanje 95 % ponavljanja daje pozitivne

rezultate. Rezultati određivanja granice detekcije utemeljeni su na 20 ponavljanja te za *VIRSeek* SARS-CoV-2 Screen ona iznosi 2 kopije po reakciji (Eurofins, 2020a).

Kit je razvijen kao početni test probira koji se koristi zajedno s *VIRSeek* SARS-CoV-2 Ident 2 (Eurofins GeneScan Technologies) i *VIRSeek* SARS-COV-2 Mplex (Eurofins GeneScan Technologies) kitovima za potvrdu u slučajevima pozitivnog testa probira. Potvrdni test provodi se detekcijom RdRp gena s *VIRSeek* SARS-COV-2 Ident 2 kitom, kod kojeg je, prema navedenom validacijskom izvještaju, granica detekcije 5 kopija po reakciji ili sekvence N-gena (N1 i N2) s *VIRSeek* SARS-COV-2 Mplex kitom. Osiguranje kontrole kvalitete testa osigurava interna procesna kontrola (IPC) za svaku reakciju i korištenje pozitivne (PC) i negativne kontrole (NC). Prema tim uputama, svi pozitivni uzorci moraju biti potvrđeni s minimalno još jednim ciljnim genom.

RdRp-gen i N-gen PCR kombinacije početnica visoko su specifične za SARS-CoV-2 i ne reagiraju unakrsno sa SARS-CoV, MERS-CoV ili sezonskim ljudskim koronavirusima HKU1, OC43, NL63, 229E. Osim toga, početnice iz ovih kitova ne reagiraju unakrsno s cDNK iz drugih uobičajenih virusa koji se prenose hranom, uključujući genogrupe norovirusa I i II, hepatitis A i E, rotavirus, adenovirus ili astrovirus (Eurofins, 2020e).

Za provedbu ispitivanja prisutnosti pojedinih genskih sekvenci metodom lančane reakcije polimeraze s reverznom transkripcijom u stvarnom vremenu korišten je uređaj PikoReal™ real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finska). Prema potrebnom broju reakcija, izračunate su i otpipetirane komponente OligoMix i BasicMix s dodatnih 10 % volumena, nakon čega su zajedno s uzorkom pomiješane u konačnu reakcijsku mješavinu. Konačna reakcijska mješavina za *VIRSeek* SARS-CoV-2 Screen i *VIRSeek* SARS-CoV-2 Ident kitove bila je pripremljena od 5 µL BasicMix reagensa, 10 µL OligoMix reagensa i 5 µL uzorka, što je činilo ukupni volumen reakcijske mješavine od 20 µL. Reakcijska mješavina za *VIRSeek* SARS-COV-2 Mplex kit pripremljena je od 5 µL BasicMix reagensa, 3 µL OligoMix reagensa i 12 µL uzorka, što je činilo ukupni volumen reakcijske mješavine od 20 µL.

Termalni profil za *VIRSeek* SARS-CoV-2 Screen i *VIRSeek* SARS-CoV-2 Ident kitove postavljen je kako slijedi: prvi korak, odnosno korak reverzne transkripcije - 10 minuta na 50 °C, a zatim drugi korak, aktivacija enzima i inaktivacija reverzne transkriptaze - 3 minute na 95 °C. Program PCR reakcije (denaturacija i sparivanje početnica) odvijao se u ukupno 40 ciklusa ponavljanja kako slijedi: denaturacija - 3 sekunde na 95 °C, sparivanje početnica (engl. annealing) i produljenje lanca (engl. extension) - 30 sekundi na 58 °C. Kanal kroz koji je detektirana fluorescencija za ciljane genske sekvence, E-gen i RdRp-gen, je Fluorescein (FAM), a unutarnja kontrola detektirana je na Cijanin-5 (Cy5) kanalu (Eurofins, 2020e, 2020c).

Rezultati su prikazani i procijenjeni putem programa PikoReal™ 2.2.248.601 (Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finska).

Termalni profil za VIRSeek SARS-CoV-2 Mplex kit postavljen je kako slijedi: prvi korak, odnosno korak reverzne transkripcije - 10 minuta na 50 °C, zatim drugi korak, aktivacija enzima i inaktivacija reverzne transkriptaze - 3 minute na 95 °C. Program PCR reakcije (denaturacija i sparivanje početnica) odvijao se u ukupno 40 ciklusa ponavljanja kako slijedi: denaturacija - 10 sekundi na 95 °C, sparivanje početnica i produljenje lanca - 30 sekundi na 60 °C. Ciljana genska sekvenca, N-gena, detektirana je fluorescencijom na FAM kanalu (Eurofins, 2020d). Rezultati su i ovaj puta prikazani i procijenjeni uz pomoć programa PikoReal™ 2.2.248.601 (Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finska).

### 3.2.8 Mikrobiološke metode

Kvantitativne i kvalitativne mikrobiološke metode korištene za kultivaciju, odnosno za određivanje prisutne mikrobiološke populacije provedene su prema protokolima propisanim u ISO normama kako slijedi:

- HRN EN ISO 4833-1:2013 - Mikrobiologija u lancu hrane -- Horizontalna metoda za određivanje broja mikroorganizama -- 1. dio: Određivanje broja kolonija pri 30 °C tehnikom zalijevanja podloge (ISO 4833-1:2013; EN ISO 4833-1:2013) (HRN EN ISO 4833-1, 2013),
- HRN EN ISO 6579-1:2017 - Mikrobiologija u lancu hrane -- Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti, određivanje broja i serotipizaciju *Salmonella* -- 1. dio: Dokazivanje prisutnosti *Salmonella* spp. (ISO 6579-1:2017; EN ISO 6579-1:2017) (HRN EN ISO 6579-1, 2017),
- HRN EN ISO 6888-2:2004 - Mikrobiologija hrane i stočne hrane -- Horizontalni postupak brojenja koagulaza-pozitivnih stafilokoka (*Staphylococcus aureus* i druge vrste) -- 2. dio: Postupak primjene agara s fibrinogenom i plazmom kunića (ISO 6888-2:1999+Amd 1:2003; EN ISO 6888-2:1999+A1:2003) (HRN EN ISO 6888-2, 2004),
- HRN EN ISO 7932:2005 - Mikrobiologija hrane i stočne hrane -- Horizontalna metoda za brojenje *Bacillus cereus* -- Tehnika brojenja kolonija pri 30 °C (ISO 7932:2004; EN ISO 7932:2004) (HRN EN ISO 7932, 2005),

- HRN EN ISO 11290-1:2017 - Mikrobiologija u lancu hrane -- Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja *Listeria monocytogenes* i drugih *Listeria spp.* -- 1. dio: Metoda dokazivanja prisutnosti (ISO 11290-1:2017; EN ISO 11290-1:2017) (HRN EN ISO 11290-1, 2017),
- HRN ISO 15213:2004 - Mikrobiologija hrane i stočne hrane -- Horizontalna metoda za brojenje sulfitreducirajućih bakterija u anaerobnim uvjetima (ISO 15213:2003) (HRN ISO 15213, 2004),
- HRN ISO 21527-1:2012 - Mikrobiologija hrane i hrane za životinje -- Horizontalna metoda za brojenje kvasaca i plijesni -- 1. dio: Tehnika brojenja kolonija u proizvodima s aktivitetom vode većim od 0,95 (ISO 21527-1:2008) (HRN ISO 21527-1, 2012),
- HRN EN ISO 21528-2:2017 - Mikrobiologija u lancu hrane -- Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja *Enterobacteriaceae* -- 2. dio: Postupak određivanja broja kolonija (ISO 21528-2:2017, ispravljena verzija 2018-06-01; EN ISO 21528-2:2017) (HRN EN ISO 21528-2, 2017).

Postupak obrade uzoraka briseva takav je da se briseve aseptički odlomi u epruvetu koja sadrži početni diluent (PPV) te se homogeniziraju vorteksiranjem 30 sekundi (HRN EN ISO 18593, 2019). Tim postupkom dobivena je početna radna suspenzija koja je iskorištena i za pripremu daljnjih decimalnih razrjeđenja, iako se s uzorkovanih površina nije očekivao veliki broj mikroorganizama.

Uzorci hrane obrađeni su u skladu s procedurama propisanim u normama HRN EN ISO 6887-1:2017 i HRN EN ISO 6887-4:2017 (HRN EN ISO 6887-1, 2017; HRN EN ISO 6887-4, 2017). Obrada podrazumijeva sterilno izdvajanje i vaganje 10 g svakog pojedinog uzorka u sterilnu vrećicu u koju je dodano 90 mL osnovnog diluenta (PPV), nakon čega je sav sadržaj homogeniziran u homogenizatoru kroz 30 sekundi. Tim postupkom dobilo se početno razrjeđenje i radna suspenzija za pripremu serije decimalnih razrjeđenja i naciepljivanje na selektivne i neselektivne hranjive podloge, ovisno o vrsti mikroorganizama. U slučajevima ispitivanja prisutnosti patogena, početni korak bilo je vaganje 25 g uzorka kojem je dodano 225 mL početnog diluenta za selektivno, odnosno neselektivno namnažanje i homogenizacija početne suspenzije, nakon koje je uslijedilo inkubiranje prema propisanim protokolima.

### 3.2.8.1 Određivanje ukupnog broja mikroorganizama

Iz početne radne suspenzije 1 mL osnovnog razrjeđenja sterilnom je pipetom otpipetiran u praznu Petrijevu zdjelicu, a isto je ponovljeno iz serije pripremljenih decimalnih razrjeđenja u epruvetama. Nakon toga se u svaku Petrijevu zdjelicu izlilo 12 – 15 mL PCA ohlađenog na 44 °C – 47 °C, inokulum se pažljivo izmiješao s medijem horizontalnim kružnim miješanjem Petrijeve zdjelice nakon čega se mješavina ostavila na vodoravnoj površini kako bi se skrutila. Vrijeme između pripreme i završetka naciepljivanja nije trajalo dulje od 45 minuta, a nakon što su se hranjive podloge skrtnule slijedila je inkubacija kroz 72 sata ± 3 sata na temperaturi 30 °C ± 1 °C.

Za određivanje broja kolonija izabrane su ploče hranjivog agara koje su sadržavale manje od 300 kolonija (10 – 300). Brojale su se pojedinačne kolonije, a prerasle kolonije brojane su kao jedna pojedinačna kolonija. Tamo gdje se očekivao veći broj kolonija ploče su brojane nakon 24 sata, a potom nakon 48 sati (HRN EN ISO 4833-1, 2013).

### 3.2.8.2 Dokazivanje prisutnosti *Salmonella* spp.

Za namnožavanje na neselektivnom tekućem mediju homogenizirano je 25 g uzorka u 225 mL puferirane peptonske vode (PPV) sobne temperature. Početna suspenzija inkubirana je na temperaturi između 34 °C i 38 °C tijekom 18 sati ± 2 sata. Selektivno namnožavanje radilo se na selektivnim tekućim medijima sobne temperature, Rappaport-Vassiliadis soja bujonu (RVS) i Muller-Kauffmann tetracionat-novobiocin bujonu (MKTTn) na način da se 0,1 mL uzorka iz neselektivnog tekućeg medija prebacilo u epruvetu s 10 mL RVS bujona, odnosno 1 mL kulture iz prednamnažanja prebačeno je u epruvetu s 10 mL MKTTn bujona. Naciepljeni RVS bujon inkubiran je na 41,5 °C kroz 24 sata ± 3 sata, a naciepljeni MKTTn bujon inkubiran je na 37 °C kroz 24 sata ± 3 sata. Kulture iz selektivnih medija naciepljene su na dva čvrsta selektivna medija. Prvi izolacijski medij je ksiloza lizin deoksikolat (XLD) agar, a drugi izolacijski medij je SS agar. Mikrobiološkom ušicom od 10 µL kulture dobivene iz RVS i MKTTn bujona naciepljene su na površine XLD i SS agara. Preokrenute ploče inkubirane su na 37 °C kroz 24 sata ± 3 sata. Tipične *Salmonella* kolonije na XLD agaru imaju crni centar s transparentno crvenkastom zonom, dok su na SS agaru kolonije prozirne s crnim centrom. U slučajevima gdje su izolirane sumnjive kolonije napravljena je subkultivacija i biokemijska potvrda. Odabrane kolonije naciepljene su na neselektivni hranjivi medij u svrhu oporavka kolonija. Biokemijska potvrda uvijek se radila iz čiste kulture – pojedinačnih kolonija, putem biokemijskih testova:

glukoza (+), saharoza (-), urea (-), L-lizin (+), mikroskopski preparat obojen po Gram-u, gdje su kolonije *Salmonella* Gram negativni štapići. U laboratoriju su korišteni gotovi biokemijski testovi API 20 E (bioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, Francuska) koji su očitani nakon inkubacije od 18 sati na temperaturi od 36 °C, a dobiveni brojevi biokemijski profil identificiran je putem web programa na računalu koji sadrži bazu podataka (APIWEB™) (HRN EN ISO 6579-1, 2017).

### 3.2.8.3 Određivanje broja koagulaza-pozitivnih stafilocoka

Iz početne radne suspenzije 1 mL osnovnog razrjeđenja sterilnom je pipetom otpipetiran u praznu Petrijevu zdjelicu, a isto je ponovljeno iz serije pripremljenih decimalnih razrjeđenja u epruvetama. Nakon toga se u svaku Petrijevu zdjelicu izlilo 18 – 20 mL cjelovitog otopljenog RPFa agara ohlađenog na temperaturu 44 °C – 47 °C, kako bi se postiglo minimalno 3 mm debljine podloge. Inokulum se pažljivo izmiješao s medijem horizontalnim kružnim miješanjem Petrijeve zdjelice nakon čega se posude s mješavinom ostavilo na vodoravnoj površini kako bi se stvrdnule. Petrijeve zdjelice koje sadržavaju stvrdnutu mješavinu uzorka i agara preokrenute su i inkubirane na temperaturi 34 °C – 38 °C kroz 24 sata ± 2 sata. Nakon inkubacije na dnu Petrijeve zdjelice označene su tipične kolonije. Sumnjive kolonije su male, crne, sive ili bijele boje, okružene svjetlom mutnom zonom (haloom) koja pokazuje aktivnost koagulaze, a tamo gdje nije bilo porasta nastavljena je dodatna inkubacija još 24 sata ± 2 sata na 34 °C – 38 °C. Nakon dodatne inkubacije označene su nove sumnjive kolonije. Kolonije se trebaju označiti nakon 24 sata ± 2 sata jer postoji mogućnost gubitka karakterističnih obilježja nakon dodatnih 24 sata ± 2 sata pa se ne preporuča brojanje samo nakon 48 sati ± 4 sata. Kolonije *Proteus* spp. mogu izgledati kao kolonije koagulaza pozitivnih stafilocoka u ranoj fazi inkubacije, međutim, mogu se razlikovati od stafilocoka nakon 24 sata ± 2 sata i 48 sati ± 4 sata inkubacije, budući da njihove kolonije postaju više ili manje smeđe i počinju se širiti.

Za brojanje izabrane su ploče na kojima je izraslo manje od 100 karakterističnih kolonija i ne više od ukupno 300 kolonija (HRN EN ISO 6888-2, 2004).

### 3.2.8.4 Određivanje broja *Bacillus cereus*

Iz početne radne suspenzije sterilnom je pipetom otpipetirano 0,1 mL osnovnog razrjeđenja na površinu selektivnog MYP agara, a isto je ponovljeno iz serije decimalnih razrjeđenja pripremljenih u epruvetama, otpipetirano je po 0,1 mL iz svake epruvete na površinu MYP agara. Suspenzije su pažljivo i u što kraćem roku nacijepljene po površini agara te su ploče

ostavljene 15 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se uzorak apsorbirao u agar. Nakon nacjepljivanja i sušenja, ploče su preokrenute i inkubirane u inkubatoru 18 – 24 sati pri temperaturi od 30 °C. U slučajevima kada kolonije nisu bile jasno vidljive, ploče su dodatno inkubirane dodatnih 24 sata prije brojanja. Nakon inkubacije, odabrane su ploče dva uzastopna razrjeđenja, koje nisu sadržavale više od 150 kolonija. Prebrojane su velike, ružičaste kolonije (ružičasta je indikator da manitol nije fermentirao), uglavnom okružene zonom precipitacije (što je indikator proizvodnje lecitina). Za potvrđne testove odabrano je pet pretpostavljenih kolonija sa svake ploče, a u slučajevima gdje je bilo manje od pet pretpostavljenih kolonija *Bacillus cereus* ispitane su sve kolonije. Odabrane kolonije nacijepljene su na površinu krvnog agara kako bi se vidjela hemoliza, a podloge su inkubirane pri temperaturi od 30 °C kroz 24 sata ± 2 sata. Potvrđene su one kolonije koje su imale zonu hemolize (HRN EN ISO 7932, 2005).

#### 3.2.8.5 Dokazivanje prisutnosti *Listeria monocytogenes*/*Listeria* spp.

Prvi korak u dokazivanju prisutnosti *Listeria monocytogenes*/*Listeria* spp. homogenizacija je 25 g ili 25 mL uzorka s 225 mL prethodno temperiranog Half-Fraser bujona, poštujući propisani omjer 1:9, nakon čega je uslijedila inkubacija na 30 °C kroz 24 sata ± 1 sat. Nakon inkubacije uzorka u prvom tekućem mediju 0,1 mL suspenzije otpipetirano je u 10 mL Fraser tekuće podloge te je suspenzija inkubirana 24 sata ± 2 sata na temperaturi 37 °C ± 1 °C. Potom je radna kultura iz Fraser bujona nacijepljena na čvrste selektivne podloge ALOA i Palcam pri 37 °C ± 1 °C tijekom 24 sata ± 2 sata. Tamo gdje je bilo potrebno, inkubacija je produžena dodatnih 24 sata. Sumnjive (tipične) kolonije *Listeria monocytogenes* na Ottaviani-Agosti agaru su plavo-zelene boje, okružene s haloom. *Listeria* spp. kolonije su plavo-zelene boje s ili bez halooa, dok neki sojevi razvijaju plavu boju. Sumnjive (tipične) kolonije na Palcam agaru sitne su, maslinasto sive kolonije, s crnim “haloom“ i ponekad s crnim centrom. Sumnjive kolonije zahtijevaju daljnje potvrđne testove koji se rade na svježim kulturama dobivenim subkultivacijom na neselektivnom agaru (krvni agar) kroz 18 – 24 sata na 37 ± 1 °C. Krvni agar služi i za dokazivanje hemolitičkih svojstava ispitivanih bakterijskih sojeva. Za potvrdu sumnjivih *Listeria monocytogenes*/*Listeria* spp. kolonija potrebno je uzeti barem jednu koloniju. Ako se dokaže da se radi o *Listeria monocytogenes*/*Listeria* spp. nema potrebe za daljnjim dokazivanjem. Ako se nije dokazala *Listeria monocytogenes*/*Listeria* spp. treba uzeti do 4 sumnjive kolonije sa svakog selektivnog medija. Obavezni potvrđni testovi za dokazivanje *Listeria monocytogenes* su: mikroskopski preparat obojen po Gram-u gdje su kolonije *Listeria*



*monocytogenes/Listeria* spp. Gram pozitivni štapići,  $\beta$ -hemoliza (+), L-Ramnoza (+) i D-Ksiloza (-). U laboratoriju su korišteni gotovi biokemijski testovi API Listeria (bioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, Francuska) koji su očitani nakon inkubacije 18 – 24 sata pri temperaturi  $36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , a dobiveni brojevi biokemijski profil identificiran je putem web programa na računalu koji sadrži bazu podataka (APIWEB™) (HRN EN ISO 11290-1, 2017).

#### 3.2.8.6 Određivanje broja sulfitreducirajućih klostridija

Nakon osnovne pripreme početne suspenzije, ista je termički obrađena u vodenoj kupelji pri temperaturi od  $75 \text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom 20 minuta (efekt pasterezacije), kako bi se uklonili vegetativni oblici bakterija s ili bez mogućnosti tvorbe spora. Sterilnom pipetom inokulirano je u duplikatu po 1 mL početne suspenzije iz najmanje dva uzastopna razrjeđenja u Petrijeve zdjelice. Isti postupak ponovljen je i za daljnja decimalna razrjeđenja. U svaku od Petrijevih zdjelica s dodanom suspenzijom izliveno je po 15 mL ISA agara prethodno ohlađenog u vodenoj kupelji na temperaturi  $44 \text{ }^{\circ}\text{C} - 47 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Medij je pažljivo promiješan horizontalnim pokretima dok se nije stvrdnuo. Kada se medij stvrdnuo, preliven je s još oko 5 – 10 mL ISA agara, a podloge su inkubirane u anaerobnim uvjetima, odnosno u posudi/vrećici pri temperaturi od  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  kroz 24 – 48 sati. Nakon inkubacije, odabrane se sve ploče na kojima je bilo manje od 150 tipičnih kolonija te ne više od 300 kolonija ukupno. Karakteristične kolonije na ISA agaru pojavljuju se kao crne kolonije okružene crnom zonom gdje je moguća pojava difuznog, nespecifičnog tamnjenja medija. Na izdvojenim karakterističnim kolonijama rade se potvrdni testovi, test respiracije i test tvorbe spora. Za test respiracije mikrobiološkom ušicom prenese se pet specifičnih kolonija dobivenih u anaerobnim uvjetima na selektivnoj podlozi (ISA) na neselektivnu podlogu (KA), nakon čega se inkubiraju na temperaturi  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  kroz 24 – 48 sati u aerobnim i anaerobnim uvjetima. U slučaju porasta kolonija u aerobnim uvjetima ne radi se o sulfitreducirajućim bakterijama, jer one rastu striktno u anaerobnim uvjetima. Za test tvorbe spora karakteristične kolonije obojimo po Gram-u i Schaffer-Fulton. Gram pozitivni štapići te prisutnost spora nakon bojenja potvrđuju da se radi o sulfitreducirajućim bakterijama (HRN ISO 15213, 2004).

#### 3.2.8.7 Određivanje broja plijesni

S obzirom na to da je kod određivanja plijesni u hrani potrebno odrediti aktivitet vode kako bi se primijenila prikladna procedura, isto je napravljeno propisanom metodom opisanom u normi

HRN ISO 21807:2005 Mikrobiologija hrane i stočne hrane - Određivanje aktiviteta vode (ISO 21807:2004). Aktivitet vode (engl. water activity;  $a_w$ ) odnosi se na dio lako dostupne, aktivne vode koju mikroorganizmi (bakterije, plijesni i kvasci) mogu koristiti za rast i metaboličku aktivnost. Prije mjerenja aktiviteta vode, uzorak je bilo potrebno dobro usitniti, nakon čega se posudicu za uzorak napunilo do polovice, pazeći da je dno posudice dobro prekriveno. Aktivitet vode izmjeren je uređajem AquaLab LITE (Decagon, USA), a koji koristi senzor za vlažnost kako bi izmjerio aktivitet vode u uzorku. Princip mjerenja temeljen je na polimeru postavljenom između dvije porozne elektrode unutar komore u koju se stavlja uzorak. Električne karakteristike polimera mijenjaju se ovisno o relativnoj vlažnosti zraka unutar komore te prenose signal koji software prikazuje brojčano kao aktivitet vode. Relativna vlažnost zraka unutar komore jednaka je aktivitetu vode uzorka. Kod većine uzoraka hrane raspodjela  $a_w$  je jednolika, a za sve ispitane uzorke gotovih jela utvrđen je aktivitet vode  $a_w > 0,95$  (HRN ISO 21807, 2005).

Iz početne radne suspenzije 0,1 mL osnovnog razrjeđenja sterilnom je pipetom otpipetiran na površinu DRBC agara, a isto je ponovljeno iz serije decimalnih razrjeđenja pripremljenih u epruvetama, otpipetirano je po 0,1 mL iz svake epruvete na površinu DRBC agara. Kod pripreme decimalnih razrjeđenja, radi brze sedimentacije spora, bilo je potrebno vorteksiranjem dobro homogenizirati uzorak te pipetu držati u vodoravnom položaju prilikom pripreme decimalnih razrjeđenja. Uzorci se prema normi HRN ISO 21527-1 inkubiraju pri temperaturi  $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  5 dana (HRN ISO 21527-1, 2012). Kada je potrebno ploče se mogu ostaviti na izvoru dnevnog svjetla još 1 – 2 dana. Ukoliko su prisutne brzo rastuće plijesni, ploče se broje 2., a zatim i 5. dan. Za određivanje broja kolonija izabrane su ploče hranjivog agara na kojima je izraslo barem 10 kolonija, ali ne više od 150. Brojana su dva uzastopna decimalna razrjeđenja, a razlika između kvasaca i plijesni utvrđena je makroskopskim pregledom. Kvasci rastu u obliku okruglih bijelih kolonija, dok plijesni rastu u obliku baršunastih i pahuljastih kolonija, nitaste su građe, a hife rastu kao isprepletana masa koja se zove micelij (HRN ISO 21527-1, 2012).

#### 3.2.8.8 Određivanje broja *Enterobacteriaceae*

Iz početne radne suspenzije 1 mL osnovnog razrjeđenja sterilnom je pipetom otpipetiran u praznu Petrijevu zdjelicu, a isto je ponovljeno iz serije pripremljenih decimalnih razrjeđenja u epruvetama. U svaku Petrijevu zdjelicu izliveno je 12 – 15 mL VRBG agara ohlađenog na temperaturu  $47\text{ °C} - 50\text{ °C}$ , a inokulum se pažljivo izmiješao s medijem horizontalnim kružnim

miješanjem Petrijeve zdjelice, nakon čega se mješavina ostavila na vodoravnoj površini kako bi se skrutila. Vrijeme od nacjepljivanja do zalijevanja agarom nije bilo dulje od 15 minuta. Nakon skrućivanja hranjiva podloga prekrila se s dodatnih 5 – 10 mL pokrovnog sloja VRBG-a kako bi se spriječilo prerastanje i postigli fakultativno anaerobni uvjeti, a podloga je ponovno ostavljena kako bi se skrtnula. Petrijeve zdjelice su preokrenute i inkubirane na temperaturi 37 °C kroz 24 sata ± 2 sata.

Karakteristične kolonije ružičaste su, crvene ili ljubičaste. Neke *Enterobacteriaceae* mogu rasti u obliku bezbojnih sluzavih kolonija, a mogu biti s ili bez izražene zone precipitacije.

Izabrane su Petrijeve zdjelice na kojima je izraslo manje od 150 karakterističnih kolonija te su porasle kolonije izbrojane. Pet sumnjivih kolonija subkultivirano je na hranjivom agaru na 37 °C ± 1 °C kroz 24 sata ± 2 sata. U slučajevima kada su *Enterobacteriaceae* uzrokovale odbojavanje kolonija ili medija i nije bilo karakterističnih *Enterobacteriaceae*, za potvrđne testove uzelo se 5 bjelkastih kolonija. Porasle kolonije potvrđene su oksidaza testom i testom fermentacije glukoze.

Kod oksidaza testa, ušicom se uzme dio izolirane kolonije i prenese na filter papir namočen oksidaza reagensom. Test se smatra negativnim ako filter papir ne promijeni boju u tamno plavu do ljubičastu, unutar 10 sekundi. *Enterobacteriaceae* su oksidaza negativne. Kod testa fermentacije glukoze, oksidaza negativne kolonije nanosi se u epruvetu koja sadrži glukoza OF medij. Površina medija prekrije se mineralnim uljem (minimalno 1 cm), a epruvete se inkubiraju pri temperaturi 37 °C kroz 24 sata ± 2 sata. Reakcija se smatra pozitivnom ukoliko dođe do žutog obojenja. Kolonije koje su oksidaza negativne i pozitivne na OF testu potvrđuju se kao *Enterobacteriaceae* (HRN EN ISO 21528-2, 2017).

### 3.2.8.9 Izračunavanje i izražavanje rezultata mikrobioloških ispitivanja

Rezultati se kod kvalitativnih mikrobioloških metoda kultivacije mikroorganizama izražavaju kao "nađeno" ili "nije nađeno" u određenoj količini testnog dijela u g ili mL proizvoda, na površini ili predmetu, npr. nije nađeno/25 g ili n.n./25 g.

Kod kvantitativnih mikrobioloških metoda rezultati se računaju putem formule uz određena pravila. Da bi rezultat bio valjan, općenito se smatra da je potrebno izbrojati kolonije barem na jednoj ploči koja sadrži najmanje 10 kolonija.

Broj mikroorganizama  $N$  prisutnih u uzorku računa se kao sredina (engl. weighted mean) iz dva uzastopna razrjeđenja korištenjem sljedeće jednadžbe:

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d} \quad (1)$$

Gdje je:

- $N$  - broj mikroorganizama
- $\sum C$  - suma kolonija izbrojanih iz dva uzastopna razrjeđenja, od kojih barem jedna sadrži najmanje 10 kolonija
- $V$  - volumen inokuluma u mL
- $d$  - razrjeđenje koje odgovara prvom razrjeđenju.

Rezultati se zaokružuju na dvije značajne znamenke te se izražavaju kao ukupan broj mikroorganizama u g ili mL.

Iznimno, prema pravilima navedenim u normi HRN EN ISO 7218:2008 Mikrobiologija hrane i hrane za životinje -- Opći zahtjevi i upute za mikrobiološka ispitivanja (ISO 7218:2007; EN ISO 7218:2007), točnije poglavlju 10.3.2.4.1 može se izraziti manji broj kao procijenjeni broj ( $N_E$ ) mikroorganizama u mL ili g, a ukoliko je izračunati broj kolonija manji od 4, rezultat se izražava kao "mikroorganizmi su prisutni, ali manje od  $4/Vd$  po gramu ili po mL" (HRN EN ISO 7218, 2008).

### 3.2.9 Statistička interpretacija podataka

Učinkovitost kitova za izolaciju određena je nagibom linije (nagib -  $b$ ) linearne regresije, iz koje se definira potrebna razina učinkovitosti ( $E$ )  $>90\%$  i  $R^2 > 0,95$ .

Formula za izračun nagiba: (2)

$$b = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum (x - \bar{x})^2}$$

Formula za izračun postotka učinkovitosti iz nagiba: (3)

$$E = -1 + 10^{(-1/\text{nagib})}$$

Formula za izračun koeficijenta determinacije: (4)

$$R^2 = 1 - \frac{RSS}{TSS}$$

Gdje je:

$R^2$  - koeficijent determinacije

RSS - zbroj kvadrata reziduala

TSS - ukupni zbroj kvadrata.

Za izračune korišten je software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, SAD, 9.4.0 673) i Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, SAD, Version 2304, Build 30 16.0.16327.20248).

## 4. REZULTATI

### 4.1 Procjena radnih karakteristika odabranih kitova za izolaciju RNK

Naglasak u prvom dijelu ispitivanja bio je na procjeni izvedbenih karakteristika četiriju komercijalno dostupnih kitova za izolaciju virusne RNK. S obzirom na to da se radi o uzorcima iz okoliša u kojima se nije očekivala velika količina ciljane virusne RNK, potencijalno poboljšanje izolacije RNK primjenom formalnog, originalnog protokola (O) postavljenog od strane proizvođača dodatno je ispitano alternativnim modificiranim protokolom (M).

Usporedba učinkovitosti kitova napravljena je tako što je korištenjem svakog izolacijskog kita izolirana RNK iz niza uzoraka pripremljenih tako da su u njih dodane jednake standardne količine ciljanog analita (mišjeg norovirusa; MNV), odnosno jednaki volumeni nerazrijeđenog MNV standarda i serije dodatna tri 10-struka razrjeđenja MNV standarda ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  i  $10^{-3}$ ). Nakon što je provedena izolacija, dobiveni eluati ispitani su putem lančane reakcije polimeraze s reverznom transkripcijom u stvarnom vremenu korištenjem *VIRSeek* Murine Norovirus detekcijskog kita (Eurofins GeneScan Technologies), nakon čega je napravljena konačna usporedba putem dobivenih  $C_t$  vrijednosti.

Rezultati prikazani u tablici 8 i tablici 9 pokazuju da su tri kita za izolaciju dala zadovoljavajuće rezultate za sve četiri razine koncentracije MNV standarda, dok u slučaju izolacijskog kita broj 4 nisu postignuti zadovoljavajući rezultati te su isključeni iz daljnje evaluacije.

Tablica 8. Rezultati  $C_t$  vrijednosti ispitanih kitova za izolaciju 1 i 2 pokazuju razlike u učinkovitosti ciljne izolacije MNV RNK i usporedni omjer vrijednosti, ovisno o tome da li je tijekom izolacije korišten etanol ili izopropanol

	Kit 1		Kit 2	
	EtOH (O) $C_t$	IPA (M) $C_t$	EtOH (O) $C_t$	IPA (M) $C_t$
MNV	26.30	29.99	33.04	30.29
MNV $10^{-1}$	29.02	33.53	35.81	32.92
MNV $10^{-2}$	32.49	37.03	39.96	36.59
MNV $10^{-3}$	36.60	40.35	43.29	39.96

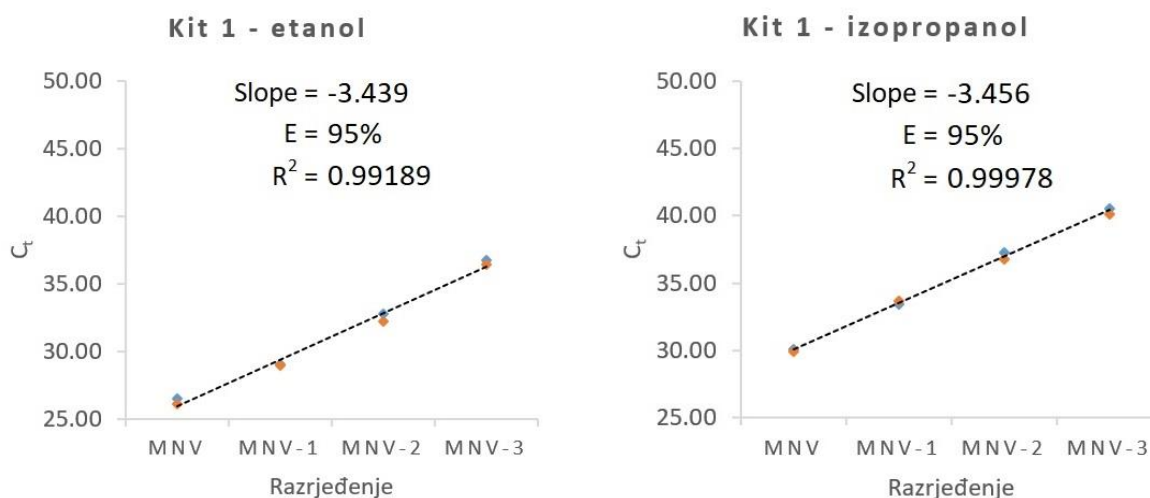
Kratice: MNV: mišji norovirus; EtOH: etanol; IPA: izopropanol; O: izvorni protokol; M: modificirani protokol;  $C_t$ : threshold cycles

Tablica 9. Rezultati  $C_t$  vrijednosti ispitanih kitova za izolaciju 3 i 4 pokazuju razlike u učinkovitosti ciljne izolacije MNV RNK i usporedni omjer vrijednosti, ovisno o tome da li je tijekom izolacije korišten etanol ili izopropanol

	Kit 3		Kit 4	
	EtOH (M) $C_t$	IPA (O) $C_t$	EtOH (O) $C_t$	IPA (M) $C_t$
MNV	31.72	28.94	37.83	38.57
MNV $10^{-1}$	33.96	31.48	40.44	41.50
MNV $10^{-2}$	37.49	34.51	-	-
MNV $10^{-3}$	40.79	39.33	-	-

Kratice: MNV: mišji norovirus; EtOH: etanol; IPA: izopropanol; O: izvorni protokol; M: modificirani protokol;  $C_t$ : threshold cycles

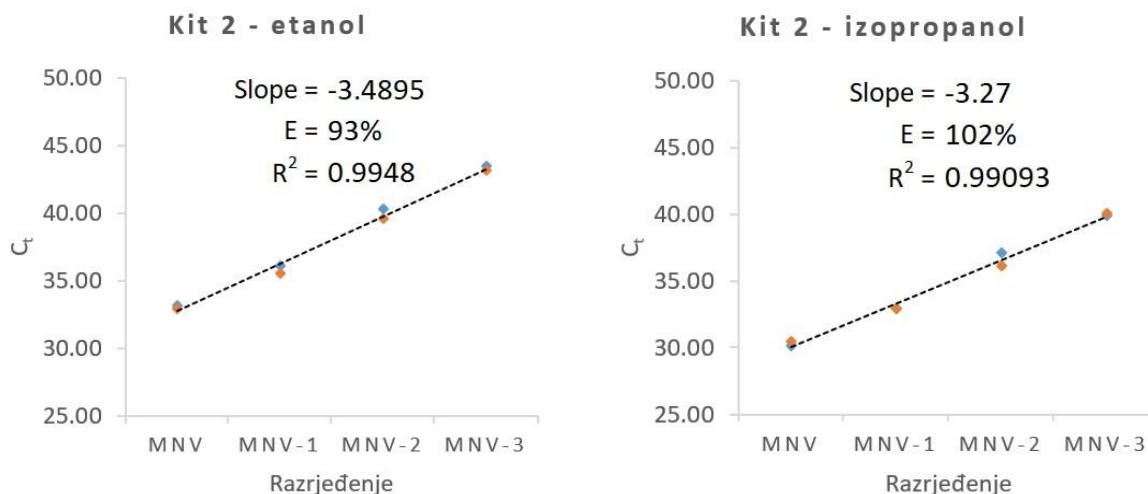
Dodatno, učinkovitost (E) tri kita za izolaciju procijenjena je i računski korištenjem rezultata dobivenih lančanom reakcijom polimeraze s reverznom transkripcijom u stvarnom vremenu, odnosno detekcijom ciljanog analita u serijama kontrolirano kontaminiranih uzoraka s MNV standardom. Svi testovi pokazali su zadovoljavajuću učinkovitost (E), dok su  $R^2$  vrijednosti svih kitova, osim kita 3 (u kojem je korišten izopropanol) bile  $> 0,99$  što zadovoljava unaprijed definiranu potrebnu razinu. Rezultati ispitivanja učinkovitosti pojedinih kitova za izolaciju korištenjem RT-PCR-a detekcijom dvostruke serije MNV standarda i dodatna tri razrjeđenja korištenjem etanola, odnosno izopropanola, prikazani su u slikama 4, 5 i 6.



Kratice: MNV: mišji norovirus; Slope: nagib; E: učinkovitost;  $R^2$ : koeficijent linearnosti standardne krivulje

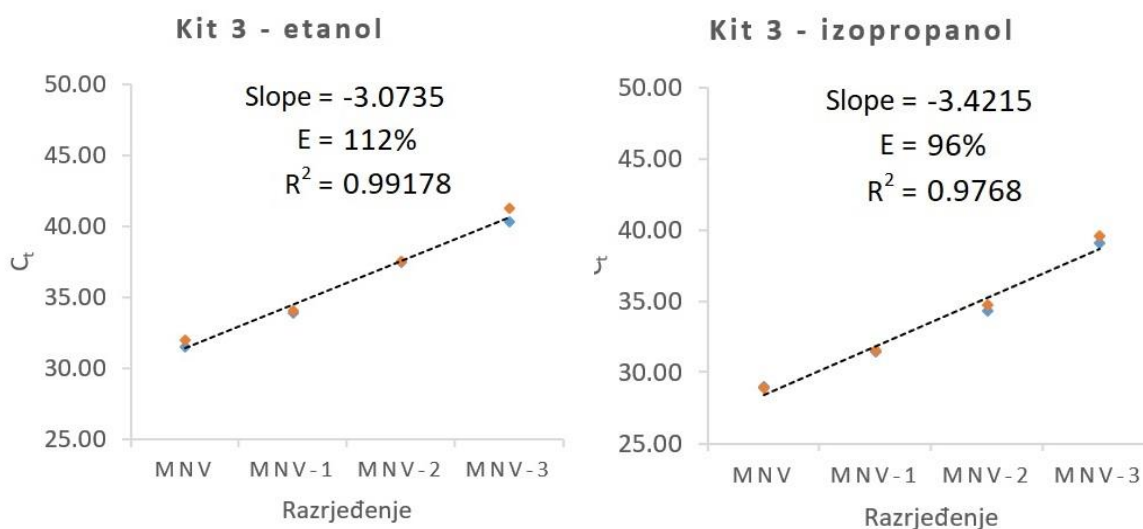
Slika 4. Prikaz rezultata ispitivanja učinkovitosti (E) kita za izolaciju 1, ispitanog RT-PCR detekcijom dvostruke serije 10-strukog razrjeđenja MNV standarda u kojima je korišten etanol, odnosno izopropanol.





Kratice: MNV: mišji norovirus; Slope: nagib; E: učinkovitost;  $R^2$ : koeficijent linearnosti standardne krivulje

Slika 5. Prikaz rezultata ispitivanja učinkovitosti (E) kita za izolaciju 2, ispitano RT-PCR detekcijom dvostruke serije 10-strukog razrjeđenja MNV standarda u kojima je korišten etanol, odnosno izopropanol.



Kratice: MNV: mišji norovirus; Slope: nagib; E: učinkovitost;  $R^2$ : koeficijent linearnosti standardne krivulje

Slika 6. Prikaz rezultata ispitivanja učinkovitosti (E) kita za izolaciju 3, ispitano RT-PCR detekcijom dvostruke serije 10-strukog razrjeđenja MNV standarda u kojima je korišten etanol, odnosno izopropanol.

## 4.2 Potvrda prikladnosti i primjenjivosti izdvojenog kita

Prikladnost odabranog kita za izolaciju dvostruko je potvrđena. Prva potvrda prikladnosti ustanovljena je sudjelovanjem u ispitivanju sposobnosti (engl. Proficiency Testing; PT) u organizaciji LGC Standards Proficiency Testing (Velika Britanija), tijekom kojeg su u ispitnom uzorku uspješno detektirane tri sekvence gena - E, RdRp i N (LGC, 2021). Na slici 7 prikazan je izvod iz izvještaja o provedenom PT ispitivanju na kojem se vidi kako je uzorak A bio pozitivan na SARS-CoV-2, dok je uzorak B bio negativan. Tri djelatnika provela su zasebno ispitivanje kako bi se kroz ponovljivost dodatno osigurala kvaliteta provedenog ispitivanja.

Scheme: Hygiene Surface Monitoring (HYGIENE)

Lab ID - HY0563 - Institute of Public Health

### 08 - Surface testing (swab rinsate) for SARS-CoV-2 molecular

Analyte	Result Field	Analyst	Method	Result	Assigned Value	Number of results	Satisfactory %	Unsatisfactory %
SARS-CoV-2	Sample A	I.K.	VIRseek SARS-CoV-2	Positive	Positive	24	79.2%	20.8%
SARS-CoV-2	Sample B	I.K.	VIRseek SARS-CoV-2	Negative	Negative	24	83.3%	16.7%
SARS-CoV-2	Sample A	VL	VIRseek SARS-CoV-2	Positive	Positive	24	79.2%	20.8%
SARS-CoV-2	Sample B	VL	VIRseek SARS-CoV-2	Negative	Negative	24	83.3%	16.7%
SARS-CoV-2	Sample A	ZM23	VIRseek SARS-CoV-2	Positive	Positive	24	79.2%	20.8%
SARS-CoV-2	Sample B	ZM23	VIRseek SARS-CoV-2	Negative	Negative	24	83.3%	16.7%

Slika 7. Prikaz rezultata iz izvještaja o provedenom PT ispitivanju.

Nadalje, primjenjivost metode potvrđena je ciljanim pilot ispitivanjem u uvjetima koji su jamčili prisutnost virusa. Konkretno, radilo se o ispitivanju briseva površina ( $N = 84$ ) u namjenskim prostorima (karanteni), u kojima su boravile osobe koje su bile asimptomatske ili su imale slabo izražene simptome bolesti COVID-19. Najmanje dvije sekvence gena uspješno su potvrđene u svim pozitivnim uzorcima. Kod uzoraka u kojima je na testu probira dobivena negativna RT-PCR reakcija nije nastavljeno daljnje ispitivanje na preostale genske sekvence. U tablici 10 prikazani su svi pojedinačni rezultati prema lokaciji i predmetu uzorkovanja te prema ispitanim genskim sekvencama. Kod uzoraka koji imaju isti naziv uzorkovani su isti predmeti u istim sobama, ali u različitim vremenskim intervalima.

Tablica 10. Prikaz svih pojedinačnih rezultata prema lokaciji i predmetu uzorkovanja te prema ispitanim genskim sekvencama

Broj uzorka	Lokacija i predmet uzorkovanja	Sekvenca gena		
		E	RdRp	N
1	Soba 209 - Daljinski upravljač za TV	+	+	+
2	Soba 209 - Kvaka sobnih vrata	-	/	/
3	Soba 209 - Toplomjer (uključujući i kućište)	-	/	/
4	Soba 209 - Sobni telefon, slušalica i tipke	+	+	+
5	Soba 210 - Kvaka sobnih vrata	+	-	-
6	Soba 210 - Toplomjer (uključujući i kućište)	-	/	/
7	Soba 210 - Sobni telefon, slušalica i tipke	-	/	/
8	Soba 210 - Toplomjer (uključujući i kućište)	-	/	/
9	Soba 402 - Daljinski upravljač za TV	-	/	/
10	Soba 402 - Kvaka sobnih vrata	-	/	/
11	Soba 402 - Umivaonik (rubovi, slavina)	-	/	/
12	Soba 402 - Sobni telefon, slušalica i tipke	-	/	/
13	Soba 306 - Umivaonik (rubovi, slavina)	-	/	/
14	Soba 306 - Prekidač svjetla	-	/	/
15	Soba 306 - Sobni telefon, slušalica i tipke	-	/	/
16	Soba 306 - Prekidač svjetla	-	/	/
17	Soba 310 - Daljinski upravljač za TV	-	/	/
18	Soba 310 - Umivaonik (rubovi, slavina)	-	/	/
19	Soba 310 - Sobni telefon, slušalica i tipke	-	/	/
20	Soba 310 - Čaša	-	/	/
21	Soba 107 - Umivaonik (rubovi, slavina)	+	+	+
22	Soba 107 - Kvaka sobnih vrata	-	/	/
23	Soba 107 - Toplomjer (uključujući i kućište)	-	/	/
24	Soba 107 - Daljinski upravljač za TV	+	+	+
25	Paviljon 7, Soba 1 - Toplomjer (uključujući i kućište)	-	/	/
26	Paviljon 7, Soba 1 - Umivaonik (rubovi, slavina)	+	+	-
27	Paviljon 7, Soba 1 - Tipkalo vodokotlića	-	/	/
28	Paviljon 7, Soba 1 - Drška četke za WC školjku	-	/	/
29	Paviljon 7, Soba 3 - Vrata hladnjaka (ručka)	+	+	-
30	Paviljon 7, Soba 3 - Tipkalo vodokotlića	-	/	/
31	Paviljon 7, Soba 3 - Umivaonik (rubovi, slavina)	+	-	-
32	Paviljon 7, Soba 3 - Drška četke za WC školjku	-	/	/
33	Paviljon 14, Soba 2 - Stranica kreveta	-	/	/
34	Paviljon 14, Soba 2 - Toplomjer (uključujući i kućište)	-	/	/
35	Paviljon 14, Soba 2 - Vrata hladnjaka (ručka)	-	/	/
36	Paviljon 14, Soba 2 - Tipkalo vodokotlića	-	/	/

37	Paviljon 7, Soba 2 - Prekidač svjetla	-		
38	Paviljon 7, Soba 2 - Tipkalo vodokotlića	-		
39	Paviljon 7, Soba 2 - Umivaonik (rubovi, slavina)	-		
40	Paviljon 7, Soba 2 - Vrata hladnjaka (ručka)	+	+	-
41	Paviljon 7, Soba 4 - Tipkalo vodokotlića	-		
42	Paviljon 7, Soba 4 - Prekidač svjetla	+	+	-
43	Paviljon 7, Soba 4 - Umivaonik (rubovi, slavina)	-		
44	Paviljon 7, Soba 4 - Vrata hladnjaka (ručka)	+	+	-
45	Paviljon 7, Soba 1 - Držač za sapun	-		
46	Paviljon 7, Soba 1 - Umivaonik (rubovi, slavina)	-		
47	Paviljon 7, Soba 1 - Toplomjer (uključujući i kućište)	+	+	-
48	Paviljon 7, Soba 1 - Vrata hladnjaka (ručka)	+	+	-
49	Paviljon 7, Soba 5 - Prekidač svjetla	+	+	-
50	Paviljon 7, Soba 5 - Umivaonik (rubovi, slavina)	-		
51	Paviljon 7, Soba 5 - Tipkalo vodokotlića	-		
52	Paviljon 7, Soba 5 - Vrata hladnjaka (ručka)	+	+	-
53	Paviljon 7, Soba 4 - Prekidač svjetla	-		
54	Paviljon 7, Soba 4 - Vrata hladnjaka (ručka)	+	+	-
55	Paviljon 7, Soba 4 - Umivaonik (rubovi, slavina)	+	+	-
56	Paviljon 7, Soba 4 - Tipkalo vodokotlića	+	+	-
57	Paviljon 7, Soba 2 - Tipkalo vodokotlića	-		
58	Paviljon 7, Soba 2 - Vrata hladnjaka (ručka)	-		
59	Paviljon 7, Soba 2 - Ormar	-		
60	Paviljon 7, Soba 2 - Umivaonik (rubovi, slavina)	-		
61	Paviljon 7, Soba 1 - Prekidač svjetla	-		
62	Paviljon 7, Soba 1 - Umivaonik (rubovi, slavina)	+	+	-
63	Paviljon 7, Soba 2 - Tipkalo vodokotlića	-		
64	Paviljon 7, Soba 3 - Umivaonik (rubovi, slavina)	-		
65	Paviljon 7, Soba 3 - Kvaka sobnih vrata	-		
66	Paviljon 7, Soba 3 - Vrata hladnjaka (ručka)	+	+	-
67	Paviljon 7, Soba 4 - Umivaonik (rubovi, slavina)	+	+	-
68	Paviljon 7, Soba 4 - Tipkalo vodokotlića	+	+	-
69	Paviljon 7, Soba 4 - Prekidač svjetla	+	+	-
70	Paviljon 7, Soba 1 - Prekidač svjetla	-		
71	Paviljon 7, Soba 1 - Umivaonik (rubovi, slavina)	+	+	-
72	Paviljon 7, Soba 1 - Tipkalo vodokotlića	-		
73	Paviljon 7, Soba 1 - Vrata hladnjaka (ručka)	-		
74	Paviljon 7, Soba 1 - Toplomjer (uključujući i kućište)	-		
75	Paviljon 7, Soba 5 - Umivaonik (rubovi, slavina)	+	+	-
76	Paviljon 7, Soba 5 - Slavina u tušu	-		
77	Paviljon 7, Soba 5 - Ručka na ormaru	+	-	-

78	Paviljon 7, Soba 5 - Vrata hladnjaka (ručka)	+	+	-
79	Paviljon 8, Soba 5 - Toplomjer (uključujući i kućište)	+	+	-
80	Paviljon 7, Soba 6 - Prekidač svjetla	-		
81	Paviljon 7, Soba 6 - Umivaonik (rubovi, slavina)	+	+	-
82	Paviljon 7, Soba 6 - Dozator dezinficijensa	-		
83	Paviljon 7, Soba 6 - Stol (radna površina)	-		
84	Paviljon 7, Soba 6 - Ormar	+	+	-

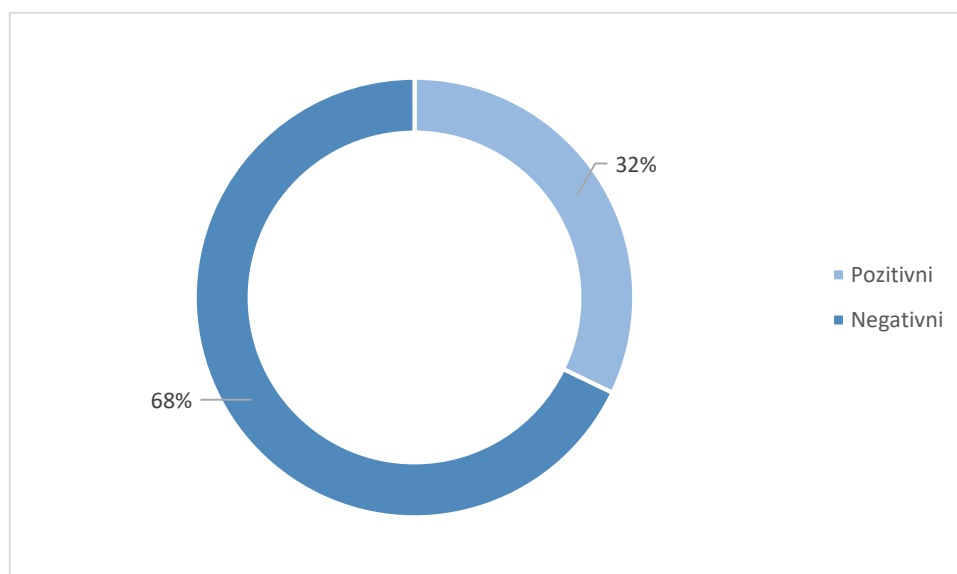
Kratice: -: negativna real-time RT-PCR reakcija, nije nađena ciljana virusna RNK; +: pozitivna real-time RT-PCR reakcija, nađena je ciljana virusna RNK

U tablici 11 prikazani su rezultati uzoraka grupirani prema mjestu uzorkovanja uz prikaz pozitivnih, odnosno negativnih uzoraka za svaku pojedinačnu skupinu. Grupe uzoraka razvrstane su tako da su od vrha prikazane najzastupljenije grupe prema udjelu pozitivnih uzoraka.

Tablica 11. Prikaz uzoraka i omjera pozitivnih, odnosno negativnih uzoraka i udjela pozitivnih uzoraka od ukupnog broja ispitanih uzoraka

<b>Mjesto uzorkovanja</b>	<b>Broj SARS-CoV-2 pozitivnih uzoraka</b>	<b>Broj SARS-CoV-2 negativnih uzoraka</b>	<b>Ukupan broj ispitanih uzoraka</b>	<b>Udio pozitivnih uzoraka (%)</b>
Vrata hladnjaka (ručka)	8	3	11	72,73
Daljinski upravljač za TV	2	2	4	50,00
Umivaonik (rubovi, slavina)	8	10	18	44,44
Ormar	1	2	3	33,33
Prekidač svjetla	3	7	10	30,00
Toplomjer (uključujući i kućište)	2	7	9	22,22
Sobni telefon, slušalica i tipke	1	4	5	20,00
Tipkalo vodokotlića	2	9	11	18,18
Kvaka sobnih vrata	0	5	5	0
Čaša	0	1	1	0
Drška četke za WC školjku	0	2	2	0
Krevet (stranica kreveta)	0	1	1	0
Slavina u tušu	0	1	1	0
Držać za sapun i dozator dezinficijensa	0	2	2	0
Stol (radna površina)	0	1	1	0
<b>Ukupno</b>	<b>27</b>	<b>57</b>	<b>84</b>	<b>32,14</b>

Ukupni omjer pozitivnih i negativnih rezultata cijelog ciljanog pilot ispitivanja zbirno su prikazani na slici 8.



Slika 8. Omjer pozitivnih i negativnih uzoraka određen temeljem rezultata pilot ispitivanja prisutnosti virusa ciljanog analita u uvjetima koji su osiguravali njegovu prisutnost.

#### **4.3 Ispitivanje prisutnosti virusa na površinama pakiranja hrane, površinama hrane i gotovim jelima**

Nakon potvrde prikladnosti i primjenjivosti izolacijskog kita, uspješnim sudjelovanjem u PT ispitivanju i provedenom ciljanom pilot ispitivanju, odabrani kit korišten je za izolaciju virusne RNK iz uzoraka briseva površina zapakirane hrane, površina hrane i gotovih jela. Nakon izolacije RNK, prisutnost ciljanih genskih sekvenci detektirana je pomoću pripremljenih *VIRSeek* SARS-CoV-2 komercijalnih kitova za sve tri planirane genske sekvence. Prvi je test probira kojim se dokazivala prisutnost E gena (kodira za protein ovojnice), a zatim i potvrdni testovi kojima se dokazivala prisutnost RdRp gena (kodira za RNK-ovisnu RNK polimerazu) i prisutnost N1/N2-gena (kodira za protein nukleokapside). Svi testovi izvedeni su u duplikatu, a uzorci kod kojih je na testu probira dobivena negativna real-time RT-PCR reakcija nisu ispitivani na preostale genske sekvence.

#### 4.3.1 Rezultati ispitivanja prisutnosti virusa na površinama pakiranja hrane i površinama hrane

Prema dobivenim rezultatima ispitivanja briseva ( $N = 60$ ) niti jedan uzorak nije bio jasno pozitivan, primjerene  $C_t$  vrijednosti i s jasnom specifičnom sigmoidalnom krivuljom. Tri uzorka imala su nespecifične krivulje izražene kasnije od predviđenog broja ciklusa od čega je samo jedna, iako nespecifična, bila u predviđenom rasponu  $C_t \leq 38$ . Taj jedan uzorak ispitan je na prisutnost RdRp gena te je opet zabilježen nejasan i nespecifičan signal, a uzorak je u konačnici ispitan i na prisutnost N gena gdje nije zabilježena pozitivna RT-PCT reakcija. Sumirani rezultati ispitanih uzoraka briseva prikazani su u tablici 12.

Tablica 12. Prikaz dobivenih rezultata ispitivanja prisutnosti virusa na površinama pakiranja hrane i površinama hrane

Ciljna genska sekvenca	Brisevi	
	Pozitivni	Negativni
E (protein ovojnice)	0 (3 slabo pozitivna)	60
RdRp (RNK-ovisna RNK polimeraza)	0 (1 slabo pozitivan)	1
N (protein nukleokapside)	0	1

Detaljni prikaz uzoraka s kojih su uzeti brisevi s nazivom uzoraka, statusom uvoza i zemlje porijekla, načina skladištenja (hlađeno ili smrznuto) te načinom pakiranja (pakirano ili rinfuza) sadržan je u tablici 13.



Tablica 13. Rezultati analize prisutnosti E gena i 2 specifična gena, RdRp i N1/N2, iz uzoraka briseva

Br. uzorka	Naziv uzorka	Zemlja porijekla	Način skladištenja	Način pakiranja	LOT broj	Sekvenca gena		
						E	R	N
1	Bijeli grejp	JAR	Hlađeno	Rinfuza	43-03	-		
2	Kruška Williams 60 mm	Srbija	Hlađeno	Rinfuza	L:3100223820 1029	-		
3	Šipak (nar) sorta Hicak	Turska	Hlađeno	Rinfuza	L:90450120T R	-		
4	Krastavac sorta Adrian	Španjolska	Hlađeno	Rinfuza	44/01	-		
5	Rajčica	Poljska	Hlađeno	Rinfuza	43-06	-		
6	Paprika mix sorta C.W.	Španjolska	Hlađeno	Rinfuza	J26-THR	-		
7	Tikvica sorta Elite	Španjolska	Hlađeno	Rinfuza	44/04	-(+)	-	-
8	Naranča sorta Valencia	JAR	Hlađeno	Rinfuza	44/04	-		
9	Japanska jabuka Persimmon	Španjolska	Hlađeno	Rinfuza	4501	-		
10	Ananas Gold	Costa Rica	Hlađeno	Rinfuza	44/02	-		
11	Jabuka sorta Idared 70 mm	Hrvatska	Hlađeno	Rinfuza	4305	-(+)	-(+)	-
12	Mandarina sorta Satsuma	Hrvatska	Hlađeno	Rinfuza	0359	-		
13	Jabuka sorta Crveni delišes	Hrvatska	Hlađeno	Rinfuza	4501	-		
14	Jabuka Jonagold	Hrvatska	Hlađeno	Rinfuza	L:9900009920 1028	-		
15	Šampinjon 500 g	Hrvatska	Hlađeno	Rinfuza	4406	-		
16	Kupus sorta Coronet	Hrvatska	Hlađeno	Rinfuza	43-01	-		
17	Rajske rajčice	Hrvatska	Hlađeno	Pakirano	L031120	-(+)	-	-
18	Blitva sorta Verca	Hrvatska	Hlađeno	Rinfuza	/	-		
19	Salata kristal Bovary	Hrvatska	Hlađeno	Rinfuza	3010	-		
20	Jabuka sorta Gala	Hrvatska	Hlađeno	Rinfuza	4404	-		
21	Panirani riblji štapići	Hrvatska	Smrznuto	Pakirano	L040820 20:26	-		
22	Pileće brzo smrznuto meso	Hrvatska	Smrznuto	Pakirano	10.10.2020./10 .01.2021.	-		
23	Panirani pileći dinosauri	Hrvatska	Smrznuto	Pakirano	26.10.2020./26 .10.2021.	-		
24	Curry & Beef Roll	Hrvatska	Smrznuto	Pakirano	110420	-		
25	Carsko povrće (cvjetača, brokula, mrkva)	Hrvatska	Smrznuto	Pakirano	44124.42243	-		

26	Pileći fritesi (panirani pileći štapići)	Hrvatska	Smrznuto	Pakirano	27.10.2020/27.10.2021.	-		
27	Pizza crispy pops (panirana piletina)	Hrvatska	Smrznuto	Pakirano	18.08.2020./18.08.2021.	-		
28	Creperolls (šunka, sir, krastavci)	Hrvatska	Smrznuto	Pakirano	230620	-		
29	Ljetni mix (grašak, mrkva, crvena paprika, krumpir, kukuruz šećerac)	Hrvatska	Smrznuto	Pakirano	43801,41407	-		
30	Savijača (okusa čokolada i višnja)	Hrvatska	Smrznuto	Pakirano	/	-		
31	Germknödel Toni Kaiser	Austrija	Smrznuto	Pakirano	L 0284 11:52	-		
32	Mlada patka	Mađarska	Smrznuto	Pakirano	L20124051	-		
33	Mini natural Baguette	Češka	Smrznuto	Pakirano	L20125408 20125408	-		
34	Francuska salata	Belgija	Smrznuto	Pakirano	3:12 L20038-LN01	-		
35	Patagonske lignje	Maroko	Smrznuto	Pakirano	98/WOF/5219	-		
36	Povrtni trio (cvjetača, brokula, mrkva)	Belgija	Smrznuto	Pakirano	08/04/22 18:57 L20099-LN01	-		
37	Bulgur mješavina (žitarice i povrće)	Španjolska	Smrznuto	Pakirano	16/10/2020 16 08:20	-		
38	Pommes frites	Belgija	Smrznuto	Pakirano	L G02 20 217 14:45	-		
39	Panirani kolutići lignje	Španjolska	Smrznuto	Pakirano	30/09/2020 01:09	-		
40	Rižoto s plodovima mora	Belgija	Smrznuto	Pakirano	L1465350D	-		
41	Trajno mlijeko, 11, 2,8 % m.m.	Hrvatska	Hlađeno	Pakirano	23/01/21 23:27 000910K21	-		
42	Jogurt 2,8 % m.m.	Hrvatska	Hlađeno	Pakirano	14-20-102274	-		
43	Mliječni desert čokolada lješnjak	Hrvatska	Hlađeno	Pakirano	13.12.20. 10:10	-		
44	Skuta	Hrvatska	Hlađeno	Pakirano	2011 20L598	-		
45	Čvrsti jogurt 3,2 % m.m.	Hrvatska	Hlađeno	Pakirano	80-20-102601	-		
46	Trajno mlijeko, 11, 3,5 % m.m.	Slovenija	Hlađeno	Pakirano	05.02.2021. 13:45:48 L6/U	-		
47	Mozzarella	Češka	Hlađeno	Pakirano	20 11 20 10:50 20 298 Kt	-		
48	Mladi kajmak	Srbija	Hlađeno	Pakirano	28.11.2020. 01:00:50	-		
49	Skyr	Slovenija	Hlađeno	Pakirano	29/11 00:27 29	-		
50	Majoneza	Srbija	Hlađeno	Pakirano	05.2021 20:40 L02476839	-		

51	Brokula Parthenon	Španjolska	Hlađeno	Rinfuza	45/01	-		
52	Paprika babura sorta Vedrana	Makedonija	Hlađeno	Rinfuza	44-03	-		
53	Lubenica Seedless	Brazil	Hlađeno	Rinfuza	44-02	-		
54	Paprika crvena California	Španjolska	Hlađeno	Rinfuza	44/04	-		
55	Jabuka Granny Smith	Hrvatska	Hlađeno	Rinfuza	L:990000992010	-		
56	Pizza margherita	Hrvatska	Smrznuto	Pakirano	L: 20247	-		
57	Pizza piccante	Hrvatska	Smrznuto	Pakirano	L: 20245	-		
58	Čašica kesten desert premium	Hrvatska	Smrznuto	Pakirano	SN: 008294 Batch: 0003	-		
59	Peanut butter	SAD	Smrznuto	Pakirano	L00233OL60	-		
60	Sladoled	Francuska	Smrznuto	Pakirano	12/2021 6 05:18 L005E3 DOE02	-		

#### 4.3.2 Rezultati ispitivanja prisutnosti virusa u gotovim jelima

Prema dobivenim rezultatima ispitivanja uzoraka gotovih jela ( $N = 40$ ) niti jedan uzorak nije bio pozitivan, odnosno nije zabilježena pozitivna RT-PCT reakcija. Rezultati svih ispitanih uzoraka gotovih jela prikazani su u tablici 14.

Tablica 14. Prikaz dobivenih rezultata ispitivanja prisutnosti virusa u gotovoj hrani spremnoj za konzumaciju (topla i hladna gotova jela)

Ciljna genska sekvenca	Gotova jela	
	Pozitivni	Negativni
E - protein ovojnice	0	40
RdRp - RNK-ovisna RNK polimeraza		
N - protein nukleokapside		

Detaljni prikaz uzoraka gotovih jela s nazivom uzoraka i vrstom gotovog jela sadržan je u tablici 15. Uzorci koji imaju isti naziv uzorkovani su u različitim vremenskim intervalima i lokacijama, a označeni su eksponentom <sup>a)</sup> ili <sup>b)</sup>.

Tablica 15. Prikaz dobivenih rezultata ispitivanja prisutnosti sekvence E gena u gotovoj hrani spremnoj za konzumaciju (topla i hladna gotova jela)

<b>Br. Uzorka</b>	<b>Naziv uzorka</b>	<b>Vrsta gotovog jela</b>	<b>SARS-CoV-2 (E gen)</b>
1	Roštilj kobasice sa sirom	toplo gotovo jelo	-
2	Salata – bijeli kupus	hladno gotovo jelo	-
3	Salata – francuska <sup>a)</sup>	hladno gotovo jelo	-
4	Salata – francuska <sup>b)</sup>	hladno gotovo jelo	-
5	Salata – grah	hladno gotovo jelo	-
6	Dinstani kiseli kupus	toplo gotovo jelo	-
7	Salata – krastavci s vrhnjem <sup>a)</sup>	hladno gotovo jelo	-
8	Salata – krastavci s vrhnjem <sup>b)</sup>	hladno gotovo jelo	-
9	Kroketi od krumpira <sup>a)</sup>	toplo gotovo jelo	-
10	Kroketi od krumpira <sup>b)</sup>	toplo gotovo jelo	-
11	Salata – krumpir	hladno gotovo jelo	-
12	Mlinci	toplo gotovo jelo	-
13	Lignje <sup>a)</sup>	toplo gotovo jelo	-
14	Lignje <sup>b)</sup>	toplo gotovo jelo	-
15	Salata – miješana	hladno gotovo jelo	-
16	Panirani dinosauri	toplo gotovo jelo	-
17	Pečene krvavice	toplo gotovo jelo	-
18	Pastrva	toplo gotovo jelo	-
19	Lazanje <sup>a)</sup>	toplo gotovo jelo	-
20	Lazanje <sup>b)</sup>	toplo gotovo jelo	-
21	Pileća krila pikant	toplo gotovo jelo	-
22	Pire krumpir	toplo gotovo jelo	-
23	Pomfrit	toplo gotovo jelo	-
24	Punjena paprika	toplo gotovo jelo	-
25	Rižoto	toplo gotovo jelo	-
26	Salata – krumpir	hladno gotovo jelo	-
27	Salata – kukuruz	hladno gotovo jelo	-
28	Salata – surimi	hladno gotovo jelo	-
29	Salata – tikvice	hladno gotovo jelo	-
30	Salata – Toscana	hladno gotovo jelo	-
31	Salata – tuna s povrćem	hladno gotovo jelo	-
32	Salata – vegetariana	hladno gotovo jelo	-
33	Salata – zagrebačka	hladno gotovo jelo	-
34	Sarma <sup>a)</sup>	toplo gotovo jelo	-
35	Sarma <sup>b)</sup>	toplo gotovo jelo	-

36	Salata – šopska	hladno gotovo jelo	-
37	Špageti bolognese	toplo gotovo jelo	-
38	Tortilja s piletinom	toplo gotovo jelo	-
39	Varivo od svinjetine i mahuna	toplo gotovo jelo	-
40	Salata – zelena s kupusom	hladno gotovo jelo	-

#### **4.4 Ispitivanje prisutne mikrobiološke populacije na površinama pakiranja hrane, površinama hrane i gotovim jelima**

Ispitivanje briseva površina ambalaže i površina hrane kao i uzoraka gotovih jela provedeno je kako bi se dobio općeniti uvid u mikrobiološko stanje te potencijalno povezivanje rezultata s onima dobivenima u ispitivanju prisutnosti virusa SARS-CoV-2.

##### **4.4.1 Rezultati ispitivanja prisutne mikrobiološke populacije na površinama pakiranja hrane i površinama hrane**

Kod briseva ispitana je šira skupina indikatorskih mikroorganizama, odnosno ukupan broj mikroorganizama, *Bacillus cereus/Bacillus* spp., *Enterobacteriaceae*, koagulaza-pozitivnih stafilokoka i plijesni, a rezultati ispitivanja prikazani su u tablici 16.

Tablica 16. Prikaz rezultata ispitivanja različitih mikroorganizama u brisevima površina hrane i pakiranja hrane

Br. uzorka	Naziv uzorka	Aerobne mezofilne bakterije (cfu/bris)	<i>Bacillus</i> spp. (cfu/bris)	<i>Bacillus cereus</i> (cfu/bris)	<i>Enterobacteriaceae</i> (cfu/bris)	Koagulaza pozitivni stafilocoki (cfu/bris)	Plijesni (cfu/bris)
1	Bijeli grejp	$2,6 \times 10^2$	-	-	-	-	-
2	Kruška Williams 60 mm	$1 \times 10^2$	-	-	-	-	-
3	Šipak (nar) sorta Hicak	$5,2 \times 10^2$	40	-	20	-	$3,3 \times 10^2$
4	Krastavac sorta Adrian	$2,8 \times 10^2$	60	-	-	-	$1 \times 10^2$
5	Rajčica	$1,5 \times 10^3$	40	-	-	50	-
6	Paprika mix sorta C.W.	$3,6 \times 10^3$	-	-	$8 \times 10^2$	-	-
7	Tikvica sorta Elite	$2 \times 10^6$	-	-	$2,3 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	-
8	Naranča sorta Valencia	$1,2 \times 10^2$	40	-	-	-	20
9	Japanska jabuka Persimmon	60	-	-	-	-	-
10	Ananas Gold	$2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^2$	40	40	$2,3 \times 10^3$	-
11	Jabuka sorta Idared 70 mm	$3,8 \times 10^2$	80	-	-	-	-
12	Mandarina sorta Satsuma	$3,2 \times 10^2$	40	-	-	-	-
13	Jabuka sorta Crveni delišes	$1 \times 10^2$	-	-	-	-	-
14	Jabuka Jonagold	$3,6 \times 10^2$	-	-	-	-	30
15	Šampinjon 500 g	$8,4 \times 10^3$	-	-	$9 \times 10^2$	-	40
16	Kupus sorta Coronet	$5,8 \times 10^2$	-	-	-	-	-
17	Rajske rajčice	-	-	-	-	-	-
18	Blitva sorta Verca	$8 \times 10^4$	-	-	$6 \times 10^4$	$2,3 \times 10^3$	$4,8 \times 10^3$
19	Salata kristal Bovary	$2,6 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	-	-	-
20	Jabuka sorta Gala	$1,5 \times 10^3$	80	-	-	$1,1 \times 10^2$	-
21	Panirani riblji štapići	$1,8 \times 10^3$	-	-	-	-	-
22	Pileće brzo smrznuto meso	$2,2 \times 10^2$	-	-	-	-	-

23	Panirani pileći dinosauri	$2,1 \times 10^3$	-	-	-	$2 \times 10^2$	-
24	Curry & Beef Roll	-	-	-	-	-	-
25	Carsko povrće (cvjetača, brokula, mrkva)	$3,4 \times 10^2$	-	-	-	-	-
26	Pileći fritesi (panirani pileći štapići)	-	-	-	-	-	-
27	Pizza crispy pops (panirana piletina)	$2 \times 10^2$	-	-	-	-	-
28	Creperolls (šunka, sir, krastavci)	40	-	-	-	-	-
29	Ljetni mix (grašak, mrkva, crvena paprika, krumpir, kukuruz šećerac)	90	-	-	-	-	-
30	Savijača (okusa čokolada i višnja)	$1,1 \times 10^2$	-	-	-	-	-
31	Germknödel Toni Kaiser	50	-	-	-	-	-
32	Mlada patka	$1,3 \times 10^2$	-	-	-	-	-
33	Mini natural Baguette	20	-	-	-	-	-
34	Francuska salata	-	-	-	-	-	-
35	Patagonske lignje	$4,2 \times 10^2$	-	-	-	60	-
36	Povrtni trio (cvjetača, brokula, mrkva)	-	-	-	-	-	-
37	Bulgur mješavina (žitarice i povrće)	-	-	-	-	-	-
38	Pommes frites	-	-	-	-	-	-
39	Panirani kolutići lignje	$1,6 \times 10^2$	-	-	-	-	-
40	Rižoto s plodovima mora	20	-	-	-	-	-
41	Trajno mlijeko, 1l, 2,8 % m.m.	20	20	20	-	-	-
42	Jogurt 2,8 % m.m.	40	-	-	-	-	-

43	Mliječni desert čokolada lješnjak	-	-	-	-	-	-
44	Skuta	60	-	-	-	-	-
45	Čvrsti jogurt 3,2 % m.m.	40	-	-	-	-	-
46	Trajno mlijeko, 1l, 3,5 % m.m.	60	-	-	-	-	-
47	Mozzarella	$1 \times 10^2$	-	-	-	-	-
48	Mladi kajmak	40	-	-	-	-	-
49	Skyr	20	-	-	-	-	-
50	Majoneza	20	40	20	-	-	-
51	Brokula Parthenon	$7 \times 10^2$	-	-	-	-	-
52	Paprika babura sorta Vedrana	$4,3 \times 10^3$	-	-	-	$3,5 \times 10^2$	-
53	Lubenica Seedless	$3,6 \times 10^2$	100	-	-	-	50
54	Paprika crvena California	$8,8 \times 10^3$	-	-	$7,9 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	-
55	Jabuka Granny Smith	$2,8 \times 10^2$	20	-	-	-	-
56	Pizza margherita	-	-	-	-	-	-
57	Pizza piccante	-	-	-	-	-	-
58	Čašica kesten desert premium	20	-	-	-	-	-
59	Peanut butter	60	-	-	-	-	-
60	Sladoled	20	-	-	-	-	-

#### 4.4.2 Rezultati ispitivanja prisutne mikrobiološke populacije u uzorcima gotovih jela

Kod uzoraka hrane, odnosno gotovih jela ispitani su mikroorganizmi prema preporukama Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu, 3. izmijenjeno izdanje (Benussi-Skukan i sur., 2011). Rezultati mikrobiološke populacije utvrđene u uzorcima hrane također su trebali poslužiti za provjeru moguće korelacije dobivenih rezultata. Ispitana je prisutnost sljedećih mikroorganizama: aerobne mezofilne bakterije, *Enterobacteriaceae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, sulfitreducirajuće klostridije, a rezultati ispitivanja prikazani su u tablici 17.



Tablica 17. Prikaz rezultata ispitivanja hrane i ocjene ispravnosti prema kriterijima Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu

Br. uzorka	Naziv uzorka	AMB (cfu/g)	E (cfu/g)	<i>Listeria monocytogenes</i> (n.n./25 g)	<i>Salmonella</i> spp. (n.n./25 g)	Koagulaza-pozitivni stafilokoki (cfu/g)	SRK (cfu/g)	Ispravnost*
1	Roštilj kobasice sa sirom	$< 10^3$	$< 10$	nije nađeno	nije nađeno	$< 1$	$< 10$	Ispravno
2	Salata – bijeli kupus	$1,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^3$	nije nađeno	nije nađeno	$< 10$	$< 10$	Neispravno
3	Salata – francuska <sup>a)</sup>	-	$1,6 \times 10^4$	nije nađeno	nije nađeno	$< 10$	$< 10$	Neispravno
4	Salata – francuska <sup>b)</sup>	$< 1 \times 10^4$	$< 10^2$	nije nađeno	nije nađeno	$< 10$	$< 10$	Ispravno
5	Salata – grah	$6 \times 10^4$	$< 10^2$	nije nađeno	nije nađeno	$< 10$	$< 10$	Neispravno
6	Dinstani kiseli kupus	$< 10^3$	$< 10$	nije nađeno	nije nađeno	$< 1$	$< 10$	Ispravno
7	Salata – krastavci s vrhnjem <sup>a)</sup>	-	$7 \times 10^3$	nije nađeno	nije nađeno	$< 10$	$< 10$	Neispravno
8	Salata – krastavci s vrhnjem <sup>b)</sup>	$10^6$	$1,4 \times 10^4$	nije nađeno	nije nađeno	$< 10$	$< 10$	Neispravno
9	Kroketi od krumpira <sup>a)</sup>	$< 10^3$	$< 10$	nije nađeno	nije nađeno	$< 1$	$< 10$	Ispravno
10	Kroketi od krumpira <sup>b)</sup>	$< 10^3$	$< 10$	nije nađeno	nije nađeno	$< 1$	$< 10$	Ispravno
11	Salata – krumpir	$3 \times 10^4$	$8 \times 10^3$	nije nađeno	nije nađeno	$< 10$	$< 10$	Neispravno
12	Mlinci	$< 10^3$	$< 10$	nije nađeno	nije nađeno	$< 1$	$< 10$	Ispravno
13	Lignje <sup>a)</sup>	$< 10^3$	$< 10$	nije nađeno	nije nađeno	$< 1$	$< 10$	Ispravno
14	Lignje <sup>b)</sup>	$< 10^3$	$< 10$	nije nađeno	nije nađeno	$< 1$	$< 10$	Ispravno
15	Salata – miješana	$10^4$	$10^2$	nije nađeno	nije nađeno	$< 10$	$< 10$	Ispravno
16	Panirani dinosauri	$< 10^3$	$< 10$	nije nađeno	nije nađeno	$< 1$	$< 10$	Ispravno
17	Pečene krvavice	$< 10^3$	$< 10$	nije nađeno	nije nađeno	$< 1$	$< 10$	Ispravno
18	Pastrva	$< 10^3$	$< 10$	nije nađeno	nije nađeno	$< 1$	$< 10$	Ispravno
19	Lazanje <sup>a)</sup>	$< 10^3$	$< 10$	nije nađeno	nije nađeno	$< 1$	$< 10$	Ispravno
20	Lazanje <sup>b)</sup>	$< 10^3$	$< 10$	nije nađeno	nije nađeno	$< 1$	$< 10$	Ispravno
21	Pileća krila pikant	$< 10^3$	$< 10$	nije nađeno	nije nađeno	$< 1$	$< 10$	Ispravno

22	Pire krumpir	$10^3$	$< 10$	nije nađeno	nije nađeno	$< 1$	$< 10$	Ispravno
23	Pomfrit	$< 10^3$	$< 10$	nije nađeno	nije nađeno	$< 1$	$< 10$	Ispravno
24	Punjena paprika	$< 10^3$	$< 10$	nije nađeno	nije nađeno	$< 1$	$< 10$	Ispravno
25	Rižoto	$10^3$	$< 10$	nije nađeno	nije nađeno	$< 1$	$< 10$	Ispravno
26	Salata – krumpir	$10^6$	$5 \times 10^3$	nije nađeno	nije nađeno	$< 10$	$< 10$	Neispravno
27	Salata – kukuruz	$3,9 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	nije nađeno	nije nađeno	$< 10$	$< 10$	Neispravno
28	Salata – surimi	$2,3 \times 10^6$	$1,2 \times 10^4$	nije nađeno	nije nađeno	$< 10$	$< 10$	Neispravno
29	Salata – tikvice	$1 \times 10^4$	$< 10^2$	nije nađeno	nije nađeno	$< 10$	$< 10$	Ispravno
30	Salata – Toscana	$4,2 \times 10^6$	$10^5$	nije nađeno	nije nađeno	$4 \times 10^2$	$< 10$	Neispravno
31	Salata – tuna s povrćem	$> 10^7$	$1,9 \times 10^4$	nije nađeno	nije nađeno	$< 10$	$< 10$	Neispravno
32	Salata – vegetarijana	$10^6$	$< 10^2$	nije nađeno	nije nađeno	$< 10$	$< 10$	Neispravno
33	Salata – zagrebačka	$1 \times 10^4$	$6 \times 10^2$	nije nađeno	nije nađeno	$< 10$	$< 10$	Neispravno
34	Sarma <sup>a)</sup>	$< 10^3$	$< 10$	nije nađeno	nije nađeno	$< 1$	$< 10$	Ispravno
35	Sarma <sup>b)</sup>	$< 10^3$	$< 10$	nije nađeno	nije nađeno	$< 1$	$< 10$	Ispravno
36	Salata – šopska	$10^6$	$1,5 \times 10^4$	nije nađeno	nije nađeno	$< 10$	$< 10$	Neispravno
37	Špageti bolognese	$< 10^3$	$< 10$	nije nađeno	nije nađeno	$< 1$	$< 10$	Ispravno
38	Tortilja s piletinom	$< 10^3$	$< 10$	nije nađeno	nije nađeno	$< 1$	$< 10$	Ispravno
39	Varivo od svinjetine i mahuna	$1,5 \times 10^5$	$1,7 \times 10^3$	nije nađeno	nije nađeno	$< 1$	$< 10$	Neispravno
40	Salata – zelena s kupusom	$10^4$	$10^2$	nije nađeno	nije nađeno	$< 10$	$< 10$	Ispravno

Kratice: SRK: sulfitreducirajuće klostridije; E: *Enterobacteriaceae*; AMB: aerobne mezofilne bakterije

\* Ocjena ispravnosti napravljena je prema kriterijima Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu, 3. izmijenjeno izdanje (Benussi-Skukan i sur., 2011)

## 5. RASPRAVA

U posljednjih nekoliko godina povećana je pozornost kako šire populacije, tako i znanstvene zajednice prema značajnijim virusnim uzročnicima bolesti povezanim s kontaminiranom hranom i vodom. U prilog tome je svakako išla i aktualna pandemija uzrokovana novim koronavirusom, a što su također u svom radu zaključili Hrđy i Vasickova (2022). Većina relevantnih nadležnih tijela za sigurnost hrane, poput EFSA-e i Agencije za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (engl. Food and Drug Administration; FDA), na svojevrsan način obvezali su se otkloniti sve preostale sumnje i pomno pratiti situaciju vezanu za virus SARS-CoV-2 i širenje bolesti COVID-19 putem hrane, točnije kroz lanac hrane. Potreba da ove, ali i druge institucije žele razjasniti situaciju oko povezanosti hrane i širenja bolesti COVID-19 ima smisla s obzirom da do sada nisu pronađeni jasni dokazi da je unos gotove hrane vjerojatan put prijenosa virusa SARS-CoV-2. O navedenoj sumnji i pokušajima razjašnjavanja rizika vezanih za takvu vrstu prijenosa pristupaju brojne studije i procjene rizika (Han i sur., 2021; Bosch i sur., 2018; Herstein i sur., 2021; FDA, 2023; EFSA, 2020; ANSES, 2020; FSA, 2020; FSANZ, 2021), a što jasno naglašava potrebu provedbe ovakvih studija. Iako za sada postoje čvrsti dokazi kako se radi o primarno respiratornom virusu te najčešće o klasičnom kapljičnom prijenosu bolesti sa zaraženih osoba na zdrave, bitno je istaknuti kako su rani slučajevi i izbijanja bolesti COVID-19 bili povezani s tržnicama, dok su se naknadni slučajevi izbijanja bolesti COVID-19 pojavljivali i ponavljali u velikim skladištima smrznute hrane iz raznih dijelova svijeta. Teorija da je veleprodajna tržnica morskih plodova Huanan u Wuhanu bila rani epicentar pandemije COVID-19 dobila je najveću potporu do sada kroz sveobuhvatnu najnoviju studiju Worobeya i sur. (2022). Naime, Worobey i sur. prikupili su i prikazali niz dokaza iz grada Wuhana u Kini gdje su zabilježene prve infekcije ljudi, a kroz svoja izvješća potvrđuju kako se većina najranijih slučajeva kod ljudi nalazila upravo oko već spomenute veleprodajne tržnice morskih plodova. Podaci su statistički obrađeni te su locirani najraniji slučajevi zaraze kod ljudi koji su bili posebno grupirani u dijelu tržnice u kojem su se okupljali prodavači živih divljih životinja i gdje su bili koncentrirani uzorci iz okoliša, a za koje se ispostavilo da su pozitivni na virus. Navode kako je u povezanom izvješću (Pekar i sur., 2022) prikazano otkriće da se genomska raznolikost prije veljače 2020. godine sastojala od dvije različite virusne loze - A i B, koje su bile rezultat najmanje dva odvojena događaja prijenosa među vrstama, odnosno sa životinja na ljude. Autori ističu kako će točni događaji oko daljnjeg širenja s čovjeka na čovjeka nakon primarne transmisije infekcije tzv. prelijevanje (engl. spillover) virusa uvijek biti nedorečeni i nejasni te kako svi posredni dokazi do sada

upućuju na više od jednog zoonoznog događaja koji se dogodio na tržnici Huanan u Wuhanu u Kini, vjerojatno tijekom studenog i prosinca 2019. godine (Worobey i sur., 2022). O stvarnom izvoru SARS-CoV-2 vežu se razne kontroverze, što se navodi i u prethodno spomenutom radu, a posljednje izvješće Ureda direktora Nacionalne obavještajne službe (eng. Office of the Director of National Intelligence; ODNI) Sjedinjenih Američkih Država (SAD) pod nazivom "Potencijalne veze između Instituta za virusologiju Wuhan i porijekla pandemije COVID-19" daje svoj zaključak utemeljen na dosadašnjim istražnim radnjama (ODNI, 2023). Ovo izvješće predstavlja odgovor na Zakon o podrijetlu bolesti COVID-19 iz 2023. godine, koji je zahtijevao od Obavještajne zajednice SAD-a deklasificiranje informacija koje se odnose na potencijalne veze između Instituta za virusologiju Wuhan (Wuhan Institute of Virology; WIV) i porijekla pandemije COVID-19. Naime, zadatak Obavještajne zajednice (engl. Intelligence Community; IC), a koja obuhvaća niz agencija bio je razjasniti da li je prva ljudska infekcija SARS-CoV-2 virusom, uzročnikom bolesti COVID-19, bila rezultat prirodne izloženosti životinji zaraženoj virusom ili incident povezan s laboratorijem. Varijacije u analitičkim stajalištima IC-a o podrijetlu pandemije COVID-19 uvelike proizlaze iz razlika u načinu na koji agencije odmjeravaju obavještajne izvještaje i znanstvene publikacije te obavještajne i znanstvene nedostatke. Ističe se kako agencije nastavljaju procjenjivati obje vjerojatnosti te kako prirodno i laboratorijsko podrijetlo ostaju prihvatljive hipoteze za objašnjenje prvog slučaja infekcije čovjeka. U navedenom izvještaju istaknuti su sljedeći zaključci (Office of the Director of National Intelligence, 2023):

- Nacionalno obavještajno vijeće i četiri druge agencije IC-a procjenjuju da je prva infekcija ljudi virusom SARS-CoV-2 najvjerojatnije bila uzrokovana prirodnom izloženošću zaraženoj životinji koja je bila nositelj SARS-CoV-2 ili bliskog pretka virusa koji je vjerojatno bio više od 99 % sličan SARS-CoV-2 virusu,
- Ministarstvo energetike i Savezni istražni ured (engl. Federal Bureau of Investigation; FBI) iz različitih razloga procjenjuju da je incident povezan s laboratorijem bio najvjerojatniji uzrok prve ljudske infekcije SARS-CoV-2,
- Središnja obavještajna agencija (engl. Central Intelligence Agency; CIA) i još jedna agencija i dalje ne mogu utvrditi točno podrijetlo pandemije COVID-19 jer se obje hipoteze oslanjaju na značajne pretpostavke ili se suočavaju s izazovima s proturječnim izvješćima,

- Gotovo sve IC agencije procjenjuju da SARS-CoV-2 nije bio genetski dizajniran. Većina agencija procjenjuje da SARS-CoV-2 nije bio laboratorijski prilagođen, dok neke agencije nisu u stanju donijeti odluku. Sve IC agencije ocjenjuju da SARS-CoV-2 nije razvijen kao biološko oružje.

Iz navedenog izvještaja vidljivo je da niti u obavještajnoj zajednici ne postoji zajednički stav oko porijekla virusa. No, ako se samo porijeklo virusa ostavi po strani, obzirom da to nije primarna tema rada, treba istaknuti da je sekvencioniranje genoma virusa SARS-CoV-2 izoliranog s tržnice Xinfadi u Kini potvrdilo da se radi o europskom soju koronavirusa (Y. Zhang i sur., 2020), što cijelu situaciju ponovno vraća na početak te otvara nova pitanja na koja neće biti lako dati odgovor.

Kroz rezultate dobivene ovom studijom daje se uvid u primjenjivost kitova za izolaciju RNK iz okolišnih uzoraka i uzoraka hrane te mogućnostima detekcije virusa i virusnih čestica SARS-CoV-2. Dobivenim rezultatima ispitivanja prisutnosti virusa na ispitanim uzorcima površina zapakirane hrane, površinama hrane i uzorcima gotovih jela zaključno se pruža uvid u stvarno stanje stvari. Treba napomenuti kako svi dobiveni rezultati prikazuju trenutno i lokalno zatečeno stanje u razdoblju provedbe ispitivanja.

### **5.1 Karakteristike odabranih kitova za izolaciju RNK i određivanje optimalnog protokola za provedbu ispitivanja**

Za provedbu ispitivanja, odnosno utvrđivanja prisutnosti virusa SARS-CoV-2 u okolišnim uzorcima i uzorcima hrane bilo je potrebno odrediti koji je najprikladniji kit za izolaciju. Procjena je napravljena ispitivanjem niza uzoraka kontrolirano kontaminiranih s MNV standardom, a potencijalno poboljšanje izolacije RNK, osim primjenom originalnog protokola postavljenog od strane proizvođača, dodatno se ispitalo alternativnim modificiranim protokolom (Mlinar i sur., 2023). Sličnu studiju proveli su Untoro i sur. (2018) uspoređujući metanol, kloroform i 2-izopropanol kao alternativna otapala etanolu u izolaciji RNK virusa dengue (DENV) tipa 2. U njihovoj studiji zaključeno je da su korišteni metanol i 2-izopropanol dali bolje rezultate od etanola. Općenito govoreći, obrada okolišnih uzoraka ima specifična ograničenja koja mogu negativno utjecati na izolaciju, ali i otkrivanje pojedinih analita. To posebno ističu i Lever i sur. (2015) koji u svojoj studiji naglašavaju kako okolišni uzorci imaju svoje specifičnosti i mogu zahtijevati specifičnu finu prilagodbu korištenih komponenti i njihovih omjera.

Prema planu pokusa, pri modifikaciji protokola pojedinih kitova gdje se u izvornom protokolu koristio etanol, korišten je izopropanol (kitovi 1, 2 i 4), dok se kod kita u kojem se prema uputama proizvođača koristi izopropanol, alternativno koristio etanol (kit 3). Pokazalo se da je izopropanol prikladniji alkohol u određenim situacijama, posebice kada se očekuje niska koncentracija RNK/DNK. S druge strane, DNK je manje topljiva u otopinama koje sadrže izopropanol nego u otopinama koje sadrže etanol. Taloženje izopropanolom provedeno je na sobnoj temperaturi kako bi se smanjio rizik od suprecipitacije otopljenih tvari, kao što su saharoza ili natrijev klorid s DNK/RNK (Green i Sambrook, 2017).

Usporedba učinkovitosti kitova napravljena je relativnom usporedbom  $C_t$  vrijednosti dobivenih ispitivanjem eluata testnih uzoraka pomoću real-time RT-PCR i korištenjem *VIRSeek* Murine Norovirus detekcijskog kita (Eurofins GeneScan Technologies). Eluati su dobiveni korištenjem svakog izolacijskog kita na nizu pripremljenih testnih uzoraka u koji su dodane jednake standardne količine ciljanog analita (mišjeg norovirusa; MNV).  $C_t$  vrijednosti obično se koriste za kvalitativne testove, kao što je određivanje prisutnosti ili odsutnosti patogena, prema čemu vrijedi da odsutnost  $C_t$  vrijednosti znači da meta, odnosno ciljani analit nije bio prisutan u toj reakciji, a prisutnost  $C_t$  vrijednosti znači da je meta bila prisutna. Brojčana vrijednost  $C_t$  obrnuto je proporcionalna količini amplikona u reakciji. Pojašnjeno, što je niži  $C_t$ , veća je količina amplikona, tj. količina ciljanog analita (Schmittgen i Livak, 2008). Dobivene  $C_t$  vrijednosti moguće je koristiti kao apsolutnu i relativnu kvantitativnu metodu, ali samo kada se može osigurati pouzdan standardni referentni materijal i uz pripremu kvalitetne standardne krivulje. Kvalitativni testovi često uključuju kontrolni gen u svrhu kontrole kvalitete, što je bio slučaj i u ispitivanjima provedenim u ovoj studiji. Ako je vrijednost  $C_t$  kontrolne analize previsoka dovodi se u pitanje valjanost ciljnog negativnog rezultata uzorka. Primjerice, problem je mogao nastati pri samom prikupljanju uzoraka, izolaciji RNK, različitim inhibitornim učincima uzoraka ili ostacima dezinficijensa, što je moglo smanjiti osjetljivost testa ispod prihvatljive razine.

Prema dobivenim rezultatima koji su prikazani u tablicama 8 i 9, vidljivo je da su tri kita za izolaciju RNK dala zadovoljavajuće rezultate za sve četiri razine koncentracije MNV standarda, dok u slučaju izolacijskog kita broj 4 nisu postignuti zadovoljavajući rezultati te su isključeni iz daljnje evaluacije. S obzirom na činjenicu da su rezultati izolacije pri korištenju kita broj 4 bili nezadovoljavajući, dodatno je ponovljena izolacija s približno jednakim ishodom pa je moguće da se radi o neprikladnom analitu za ovu vrstu ispitivanja ili svojevrsnom antagonizmu izolacijskog kita i korištenog analita, a ne o stvarnim mogućnostima kita za izolaciju.

Kod ispitivanja svojstava izolacijskih kitova u smislu usporedbe originalnog i pokusnog, optimiranog protokola, jedino su kod izolacijskog kita 2 postignuti značajno bolji rezultati s optimiranim protokolom. To se vidi kroz činjenicu da su jednake koncentracije MNV standarda rezultirale s nižim  $C_t$  vrijednostima, odnosno iste su dobivene približno 3 ciklusa ranije nego je to postignuto s originalnim protokolom.

Gledajući ukupne rezultate prikazane u tablicama 8 i 9, može se zaključiti kako je izolacijski kit broj 1 dao najbolje rezultate i to s originalnim protokolom prema uputama proizvođača. Drugi najbolji rezultat postignut je s izolacijskim kitom 2, ali tek s optimiranim protokolom, dok je prema rezultatima ispitivanja na trećem mjestu izolacijski kit 3 kod kojeg se primijenio originalni protokol prema preporukama proizvođača.

Sličnu studiju proveli su O'Brien i sur. (2021), ali za otkrivanje SARS-CoV-2 virusa u otpadnim vodama. Izolacijski kitovi korišteni u toj studiji specifični su po tome što mogu sadržavati dodatne korake uklanjanja inhibitora, tako da nisu izravno usporedivi. U studiji Ambrosi i sur. (2021) također su se usredotočili na učinkovitost izolacije i modifikaciju protokola. U spomenutoj studiji, pravilno isparavanje etanola (kako bi se smanjila kasnija interferencija real-time RT-PCR reakcije) i produženo vrijeme inkubacije tijekom elucije i centrifugiranja istaknuti su kao kritični koraci u izolaciji RNK. Navedene modifikacije pokazale su učinkovitost i preporučuju se za primjenu na kitovima koji su bili predmet studije za poboljšanje izolacije RNK za automatsku i ručnu izolaciju. Konačno, studija Ransom i sur. (2020) prikazuje usporedbu tri kita (sustava) za automatsku izolaciju RNK iz kliničkih uzoraka gdje je vidljivo da su sva tri kita zadovoljavajuće učinkovita, dok se jedan kit istaknuo nešto boljim rezultatima u pogledu viših vrijednosti  $C_t$  nakon real-time RT-PCR ispitivanja. Autori zaključuju da je to vjerojatno rezultat upola manjeg volumena elucije, a time i veće koncentracije RNK. Također, tu su i slične studije Kasterena i sur. (2020) i Shen i sur. (2021), no ovoga puta radilo se o procjeni dijagnostičkih kitova. Nažalost, u malo je studija provedena ovakva vrsta evaluacije zbog čega nije nemoguće napraviti izravnu usporedbu rezultata dobivenih u ovoj studiji.

S obzirom na to da je kit 1 pokazao najbolje rezultate (tablice 8 i 9), isti je izdvojen za nastavak provedbe ispitivanja u daljnjem tijeku studije, a važno je istaknuti da su i ostali izračuni potvrdili primjenjivost kita (slika 4). Prvenstveno zadovoljavajuću razinu učinkovitosti,  $E > 90 \%$ , a zatim i zadovoljavajući koeficijent linearnosti standardne krivulje,  $R^2 = 0.99189$ . Nagib (slope) = -3,439 također je zadovoljavajuće vrijednosti, s obzirom na to da bi se vrijednost trebala kretati od -3,10 do -3,60.

## 5.2 Prikladnost i primjenjivost izdvojenog kita

Uzimajući u obzir povoljne rezultate procjene karakteristika izolacijskog kita 1, prikladnost i primjenjivost kita dodatno je potvrđena kroz još dva ispitivanja. Prva provjera je provedena tako što je pronađena prikladna PT shema za ispitivanje sposobnosti - “Environmental Hygiene Monitoring (HYGIENE), PT-HY-08” u organizaciji LGC Standards Proficiency Testing (UK) gdje su pripremljeni i dostavljeni uzorci koji su sadržavali  $2 \times 1,5$  mL tekućeg uzorka, od kojih je jedan uzorak sadržavao SARS-CoV-2 na približnoj razini od 1 092 kopija genoma/mL (LGC, 2021). Uzorci su obrađeni izabranim izolacijskim kitom te su nakon toga ispitani detekcijskim kitovima za real-time RT-PCR. Korišteni su kitovi identični onima koji su se koristili u ispitivanju svih ostalih uzoraka ispitanih za potrebe ovog rada. Ispitivanjem dostavljenih uzoraka u jednom od njih potvrđen je i uspješno detektiran virus SARS-CoV-2, a analitički su potvrđene tri sekvence gena - E, RdRp i N, što je potvrđeno izvještajem nakon provedenog PT ispitivanja (LGC, 2021). Dobiveni rezultati konačno su potvrdili da se metoda provodi prikladno, odnosno da se uređaji i predmetni kitovi pravilno koriste (slika 7).

Nadalje, u drugoj provjeri primjenjivost kita i metode izvedeno je ciljano pilot ispitivanje u uvjetima koji su jamčili prisutnost virusa, odnosno virusnih čestica SARS-CoV-2. Provedeno je ispitivanje uzoraka površina uzorkovanih u namjenskim prostorima tj. prostorima koji su služili kao karantena za boravak osoba s asimptomatskim oblikom bolesti ili sa slabo izraženim simptomima bolesti COVID-19. Izuzeta su ukupno 84 uzorka za koje se pretpostavljalo da bi mogli biti najveći rezervoar virusa jer su i najčešća mjesta kontakata. Ciljano su uzeti uzorci s vlažnih, hladnijih mjesta, kao i oni s predmeta ili mjesta koje su suhi i stabilne sobne temperature. Uzorci i broj uzetih jedinica uzoraka su: ručka hladnjaka (11), daljinski upravljač (4), umivaonik (18), ormar (3), prekidač za svjetlo (10), toplomjer (9), telefon (5), tipka vodokotlića (11), kvaka sobnih vrata (5), čaša (1), četka za WC (2), krevet (1), slavina u tušu (1), držač za sapun/dozator dezinficijensa (2) i stol (1), a prikazani su u tablici 10. Prema prikazanim rezultatima, grupa uzoraka s najvećim udjelom pozitivnih uzoraka (72,73 %) su uzorci ručke hladnjaka, zatim uzorci daljinskog upravljača (50 %) i umivaonika (44,44 %). Prema prve tri najzastupljenije skupine pozitivnih uzoraka, može se zaključiti da se virus više zadržava na nešto hladnijim i vlažnijim mjestima, posebice ako se uzme u obzir relativno mali broj uzoraka daljinskih upravljača. Ono što je važno napomenuti je da su najmanje dvije sekvence gena uspješno potvrđene u svim uzorcima. Kako je prikazano na slici 8, udio pozitivnih uzoraka je značajan (32 %), točnije 27 uzoraka od ukupno ispitanih 84 uzorka pozitivno je na prisutnost SARS-CoV-2. Vezano za dobivene rezultate ispitivanja, važno je



istaknuti da niti jedan uzorak nije imao zabilježene inhibicije uzorka tijekom PCR reakcije, što je samo po sebi jasan znak da čišćenje i sanitacija nisu obavljene neposredno prije uzorkovanja. Dobiveni rezultati iznimno su znakoviti u smislu da jasno ukazuju na važnost provođenja svih propisanih higijenskih mjera, kao i onih u vezi socijalnog distanciranja. Naime, osnovna pretpostavka i za ovu studiju leži u tome da rizik zarazom preko površina hrane i same hrane proizlazi u slučajevima kada takve osobe (bez simptoma ili s blago izraženim simptomima bolesti COVID-19) rade na pripremi, posluživanju ili u prometu hrane. Kada tome pridodamo činjenicu da su se neke od  $C_t$  vrijednosti, dobivenih ispitivanjem tih uzoraka, kretale ispod dvadesetog ciklusa, onda ne treba preispitivati niti stvarnu mogućnost zaraze tako značajno kontaminiranim površinama. Slično ističe i Njemački savezni institut za procjenu rizika (njem: Bundesinstitut für Risikobewertung; BfR), navodeći da se koronavirus može pronaći na priboru za jelo i posuđu te da izvor može biti usmjereno kihanje ili kašljanje zaražene osobe. Iako navedeno može izazvati infekciju ako virus dospije na sluznicu nosa ili očiju naglašava se kako dosad nisu zabilježili takve infekcije (BfR, 2022). Takvi stavovi se ističu u nekoliko studija spomenutih u radu gdje je virusna RNK otkrivena na uzorcima hrane i kako najvjerojatnije potječe od zaraženih osoba unutar lanca prerade i distribucije prije pakiranja. Razlog bi mogli biti i pogoni za preradu hrane, često identificirani kao žarišta za COVID-19 zbog pretrpanih radnih mjesta, bliskih kontakata s kolegama, zajedničkog prijevoza ili stanovanja (Dyal i sur., 2020; Waltenburg i sur., 2021; Han i sur., 2021). Jedna studija otkrila je kako je fizički kontakt i dijeljenje hrane tijekom konferencije u Singapuru bio najvjerojatniji razlog obolijevanja skupine ljudi od bolesti COVID-19 (Pung i sur., 2020).

U studiji Ong i sur. (2020) ispitani su zrak i prostori u kojima su se nalazili simptomatski bolesnici s blagim i umjerenim kliničkim simptomima. Studija je pokazala da je čak 87 % uzoraka bilo pozitivno, dok su primjerice u drugoj studiji pozitivni rezultati uzoraka iz okoliša na jedinicama intenzivne njege (JIL) i COVID-19 odjelima bili također znatno izraženi. Rezultati su pokazali kako su od 57 ukupno ispitanih uzorka na JIL čak 54 bila pozitivna, što čini udio od 94,7 %, a na COVID jedinici su svi uzorci bili pozitivni od ukupno 9 ispitanih uzoraka (Guo i sur., 2020). Zhou i sur. (2021) u svojoj studiji navode kako su od ukupno 218 obrađenih površinskih uzoraka imali 91 potencijalno pozitivan uzorak (41,7 %), odnosno u konačnici su to bila 23 uzorka pozitivna na prisutnost RNK SARS-CoV-2 virusa, što čini ukupni udio od 10,6 % pozitivnih uzoraka. Kultivacija virusa nije uspjela iz nijednog uzorka koji je bio pozitivan na SARS-CoV-2. Različite površinske kontaminacije potvrđene su na nizu predmeta koje je koristilo medicinsko osoblje na COVID jedinicama, a posebno na računalnim tipkovnicama i miševima, stolcima i dispensorima za alkohol te su ti predmeti izdvojeni kao

rizični za kontaminaciju SARS-CoV-2 (Wu i sur., 2020; Ye i sur., 2020; Guo i sur., 2020). Zhao i sur. u studiji navode laboratorijske podatke za SARS-CoV-2 koji pokazuju da  $C_t$  vrijednosti  $C_t = 29,3$  (čelična površina) i  $C_t = 29,5$  (plastična površina) koreliraju s otkrivanjem virusa koji se može uzgajati, dok  $C_t$  vrijednosti  $C_t = 32,5$  (čelična površina) i  $C_t = 32,7$  (plastična površina) koreliraju s otkrivanjem virusa koji se ne može uspješno kultivirati. Također, autori ističu kako vrijednost  $C_t > 30$  dobivena iz uzorka površina vjerojatno nema epidemiološki značaj te napominje činjenicu da je osušeni inokulum s  $C_t$  vrijednostima  $< 30$  (što odgovara broju kopija E gena od  $\geq 10^5$  po mL) bio povoljan za kultivaciju SARS-CoV-2 (Zhou i sur., 2021).

### **5.3 Prisutnost virusa na površinama pakiranja hrane, površinama hrane i gotovim jelima**

Rezultati ispitivanja uzoraka briseva s prvim kitom za probir (ciljana sekvenca E gena) pokazali su tri slabo pozitivna rezultata, jedan s  $C_t$  vrijednosti  $< 38$  i još dva uzorka s  $C_t$  vrijednosti  $> 38$ . Kod kita za probir korištene su postavke automatskog ograničenja praga fluorescencije (threshold) i kriteriji iz uputa proizvođača ( $C_t \leq 38$ ). Treba napomenuti da su tako visoke  $C_t$  vrijednosti, odnosno kasni ciklusi, očekivani i uobičajeni u uzorcima iz okoliša, posebno zato što nisu iz područja u kojem se može očekivati prisustvo virusa, kao u slučaju gdje se potvrđivala prikladnost kitova. U studiji Ong i sur. (2020), prosječna  $C_t$  vrijednost bila je  $C_t = 36,08$ . Uzorci koji su pokazali slabo pozitivne  $C_t$  vrijednosti uključivali su sva tri uzorka iz kategorije svježih i ohlađenih namirnica, točnije svježe voće i povrće. Kod sva tri slabo pozitivna rezultata zajedničko je nepostojanje karakteristične sigmoidalne krivulje pojačanja te se kao takvi ne mogu smatrati potpuno validnim rezultatima. Svi takvi uzorci, prema preporukama i planu, dodatno su ispitani na prisutnost SARS-CoV-2 specifičnog RdRp gena, VIRSeek SARS-COV-2 Ident 2 kitom. Od tri ispitana uzorka samo jedan je imao pozitivan rezultat u pogledu dobivene  $C_t$  vrijednost, ali je i kod ove reakcije izostala karakteristična sigmoidalna krivulja pojačanja. Isti uzorak ispitan je i na prisutnost N gena s VIRSeek SARS-COV-2 Mplex kitom, a pri evaluaciji tih rezultata nije zabilježen pozitivan signal, odnosno  $C_t$  vrijednost nije bila izražena (tablice 12 i 13). Uz ispitivanje površina na prisutnost virusne RNK SARS-CoV-2, površine su ispitane i na opću mikrobiološku (bakterijsku) populaciju. Ispitivanje je uključivalo širu skupinu indikatorskih mikroorganizama, točnije ukupan broj mikroorganizama, *Bacillus cereus/Bacillus* spp., *Enterobacteriaceae*, koagulaza-pozitivne stafilokoke i plijesni.

Rezultati ispitivanja u većini slučajeva bili su zanemarivi, očekivano niske mikrobne populacije ili ispod granice kvantifikacije pa se kao takvi nisu mogli iskoristiti za relevantnu procjenu mikrobiološke čistoće ispitanih predmeta. Par uzoraka kod kojih je zabilježen nešto veći ukupan broj mikroorganizama, *Enterobacteriaceae* i koagulaza pozitivnih stafilokoka (*Staphylococcus aureus*) su uzorci br. 7 (Tikvica sorta Elite), 10 (Ananas Gold), 18 (Blitva sorta Verca) i 54 (Paprika crvena California) (tablica 16). S obzirom na dobivene rezultate ispitivanja prisutnosti ciljane virusne RNK i ciljane bakterijske populacije, rezultati se ne mogu dovesti u korelacijsku vezu jer iz ispitanih uzoraka nije izolirana ciljana RNK.

Ispitivanja uzoraka gotovih jela s kitom za probir (ciljana sekvenca E gena) također nisu pokazali pozitivne rezultate. Uzorci hrane ispitani su i prema preporučenim kriterijima Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu, 3. izmijenjeno izdanje (Benussi-Skukan i sur., 2011). Sukladno Vodiču, uzorci su ispitani prema sljedećim mikroorganizmima: aerobne mezofilne bakterije, *Enterobacteriaceae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* i sulfitreducirajuće klostridije. Što se tiče rezultata ovog ispitivanja uzoraka hrane prema preporučenim mikrobiološkim kriterijima Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu, 3. izmijenjeno izdanje (Benussi-Skukan i sur., 2011), 15 od ukupno 40 ispitanih uzoraka nije zadovoljilo zadane kriterije. Najčešći razlog nesukladnosti uzoraka bio je povišen broj mikroorganizama i prisutnost većeg broja enterobakterija (tablica 17). Unatoč tako visokom broju nesukladnih uzoraka, odnosno udjelu od 37,5 % nesukladnih rezultata, isti nisu iskoristivi za bilo kakvu daljnju obradu u smislu postojanja korelacijske veze s prisustvom ciljane virusne skupine, s obzirom na to da virusna RNK ciljanog analita nije nađena.

Rezultati ispitivanja briseva površina dobiveni u ovoj studiji mogu se tek djelomično usporediti s onima dobivenim u studijama Colaneri i sur. (2020; 2020) koji su ispitali prisutnost SARS-CoV-2 na neživim površinama u bolničkim odjelima, prijavivši samo jedan pozitivan rezultat ( $N = 32$ ) uz napomenu kako su rezultati pilot ispitivanja provedenog za potrebe ove studije bilježili znatno više pozitivnih rezultata. O mogućnostima zaraze u stvarnim, svakodnevnim uvjetima pisali su Kampf i sur. (2021) te Mondelli i sur. (2021) i to u kontekstu kako je u stvarnim uvjetima rizik od prijenosa s fomita koji nisu bili u nedavnom kontaktu sa zaraženom osobom ograničen. Autori zaključuju kako je rizik smanjen zbog niske koncentracije virusnih čestica na njima i niskih stopa prijenosa virusa s površina na ruke. Nadalje, Pitol i Julian (2021) u svojoj studiji pomoću modeliranja i procjene mikrobnog rizika (engl. Quantitative Microbial Risk Assessment; QMRA) prijenos s fomita iskazali su kao 1 prema 10 000. Svojedobno je i američki Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (Center for Disease Control and Prevention;

CDC) imao stav kako je takav put prijenosa moguć, iako vrlo malo vjerojatan, ističući da je i dalje glavni put prijenosa respiratornim putem, odnosno kapljičnim putem preko zaraženih osoba (NCIRD/CDC, 2021). Zaključak više studija, uključujući i CDC, jest da prijenos virusa nije vjerojatan ukoliko se provode propisane procedure čišćenja i dezinfekcije, s obzirom na visoku osjetljivost virusa na sredstva za dezinfekciju (NCIRD/CDC, 2021; Mondelli i sur., 2021; Xiling i sur., 2021).

Jedna od recentnijih studija potvrđuje koliko dug period virus SARS-CoV-2 može ostati infektivan. Naime, u toj se studiji ističe kako SARS-CoV-2 ostaje zarazan na rashlađenoj delikatesnoj hrani, mesu i svježim proizvodima do 21 dan (Jia i sur., 2022). Rezultati te studije podudaraju se s rezultatima studija koje su istaknule jasne indicije ili potvrdile kako su mnoga žarišta bila hladnjače kao i druga različita skladišta hrane, tržnice pa čak i restorani (Han i sur., 2021; Riddell i sur., 2020). Studije ističu kako koronavirusi u takvim uvjetima mogu ostati vijabilni od 28 do čak 49 dana (utemeljeno na saznanjima baziranim na SARS-CoV-1 virusu). Svih 40 ispitanih uzoraka gotovih jela ispitanih u ovoj studiji bilo je negativno na prisutnost E-gena (tablice 14 i 15). Nisu zabilježene razlike u ispitivanju ili rezultatima ispitivanja bez obzira na lokaciju trgovine, dan ili vrijeme uzorkovanja, kao niti mikro-lokaciju unutar trgovine. Svi uzorci okvalificirani su kao negativni na prisutnost RNK SARS-CoV-2 virusa ili su vrijednosti bile ispod granice detekcije metode. Važno je istaknuti da su rezultati pozitivnih i negativnih kontrola bili valjani (unutar očekivanih raspona) za sve ispitane uzorke. Povećanje broja dnevnih slučajeva zaraženih osoba, tijekom provedbe studije nije rezultiralo pojavom uzoraka kod kojih je zabilježen rezultat pozitivan na SARS-CoV-2.

Rezultata ispitivanja prisutnosti virusa ili virusnih čestica SARS-CoV-2 iz uzoraka hrane širokog spektra na tržištu nema ili su iznimno malo zastupljeni i dostupni samo za pojedinačne slučajeve (Han i sur., 2021; Aboubakr i sur., 2021; Eslami i Jalili, 2020; Rabenau i sur., 2004; Yépez-Gómez i sur., 2013; SCDC, 2020). Za tumačenje ovih rezultata, ali i općenito shvaćanje ponašanja virusa SARS-CoV-2 i sličnih virusa u hrani, posebno je važna studija Jia i sur (2022). Naime, kako bi se odredio relativni potencijal moguće zaraze putem različite vrste hrane u studiji su se bavili procjenom preživljavanja virusa SARS-CoV-2 na tri vrste, tj. tri najzastupljenije grupe hrane. Radilo se o hladnim delikatesnim proizvodima spremnim za jelo, svježim proizvodima i mesu (uključujući i plodove mora). Za potrebe ispitivanja, uzorci hrane su inokulirani s 20  $\mu$ L suspenzije koja je sadržavala  $1 \times 10^4$  PFU (engl. Plaque-Forming Units; PFU) SARS-CoV-2 u više malih kapljica ( $<1 - 2 \mu$ L po kapljici) na površinu hrane, pod pretpostavkom da bi se tako najbolje oponašalo taloženje virusa sadržanog u kapljicama iz kašlja ili kihanja. U svrhu procjene maksimalnog oporavka virusa iz svake pojedinačne vrste

hrane, prisutnost virusa ispitana je odmah nakon inokulacije (0 h). Uzorci hrane koji su dodatno inokulirani za naknadna ispitivanja pohranjeni su u zatvorenim spremnicima (kako bi se spriječilo isušivanje) na temperaturi hlađenja (4 °C). Ispitivanje je provedeno sukcesivno kroz jasno određene vremenske intervale, nakon: 1 sata, 24 sata, 7 dana, 14 dana i nakon 21 dana od inokulacije. Dobiveni podaci pokazali su zanimljive i indikativne rezultate, jer su delikatesni proizvodi i meso s visokim sadržajem proteina, masti i vlage održavali infektivnost SARS-CoV-2 virusa do čak 21 dan, a prerađeno meso poput salame i nekih svježih proizvoda pokazivali su svojevrzne antivirusne učinke. U studiji se tumači kako bi relativno suho okruženje kod takvih proizvoda moglo pridonijeti inaktivaciji virusa, dok kiselost vjerojatno neće značajno pridonijeti inaktivaciji, budući da su prethodne studije objavile da SARS-CoV-2 nije osjetljiv na inaktivaciju u širokom rasponu pH vrijednosti (3 – 10) na sobnoj temperaturi (Chin i sur., 2020; Yekta i sur., 2021). Jia i sur. (2022) objašnjavaju kako su razlog tome dodani konzervansi i pojačivači okusa, poput fenolnih spojeva butiliranog hidroksianisola (BHA) koji ima snažna antioksidativna i antimikrobna svojstva i butiliranog hidroksitoluena (BHT) koji se dodaju različitim proizvodima, u ovom slučaju salami, u svrhu povećanja sigurnosti hrane, ali i različitih tehnoloških razloga. Zabilježeno je da i BHT inaktivira dio virusa s ovojnicom, uključujući herpes simplex virus (HSV) i virus newcastleske bolesti (Reimund, 1987). Osim navedenoga, ističu još nekoliko važnih činjenica vezanih za sigurnost hrane iz aspekta vektora za SARS-CoV-2 virus. Ističu kako su organske kiseline poput limunske kiseline koja se dodaje salami kako bi poboljšala okus i mliječne kiseline, koja nastaje tijekom procesa fermentacije navedene kao aktivni sastojci SARS-CoV-2 dezinficijensa, koje je odobrila Agencija za zaštitu okoliša u Sjedinjenim Državama (Pedreira i sur., 2021). Pretpostavka je da bi prisutnost tih organskih kiselina u salami mogla imati dodatne antivirusne učinke protiv SARS-CoV-2, dakako, uz sinergističko djelovanje sa sveobuhvatnim učincima niske vlage, niskog aktiviteta vode, antioksidativnih aditiva i drugih organskih kiselina proizvedenih tijekom fermentacije. Inokulirani SARS-CoV-2 ostao je prisutan i zarazan u mljevenoj govedini koja je kuhana na nižoj (engl. rare) ili srednjoj (engl. medium) temperaturi karakterističnoj za pripremu ove vrste mesa te u svakom slučaju nedovoljno termički obrađenom mesu. Ističe se kako je SARS-CoV-2 tijekom vremena inaktiviran na hrani, dok virusna RNK nije degradirana s jednakim trendom te bez obzira na vrstu hrane. Rezultati temeljeni na real-time RT-PCR-u za otkrivanje patogena u hrani samo ukazuju na prisutnost virusne RNK, ali ne koreliraju s prisutnošću ili količinom infektivnih virusa (Jia i sur., 2022). Iz kategorije svježih proizvoda, uglavnom voća i povrća, rajčica i grožđe dali su najznačajnije rezultate u smislu preživljavanja virusa. Ti rezultati govore da je virus ostao konstantan kroz 7 dana od inokulacije ( $p > 0,05$ ), ali je infektivnost virusa

značajno smanjena do 14 dana od inokulacije. Unatoč tome, više od 1 log PFU/mL (engl. plaque-forming units) infektivnog virusa bilo je prisutno na rajčici i grožđu nakon 21. dana u uvjetima hlađenja (4 °C). Studija Jia i sur. (2022) nedvojbeno je potvrdila preživljavanje i visok stupanj oporavka SARS-CoV-2 na određenoj hrani, od koje je dio spreman za jelo ili se konzumira sirov. Rezultati istraživanja recentnije studije Peng i sur., (2023) pokazali su da su temperatura hladnog lanca i sol čimbenici rizika koji dodatno mogu produžiti održivost SARS-CoV-2 i povećati rizik od prijenosa SARS-CoV-2. Takvi rezultati studije podržavaju tezu kako hrana kontaminirana sa SARS-CoV-2 virusom potencijalno može biti izvor infekcije, uz naglašenu važnost pravilnog rukovanja hranom i kuhanja kako bi se prije konzumacije inaktivirao svaki potencijalno infektivni virus.

O važnosti postavljanja fokusa nadležnih tijela na identifikaciju različitih virusnih patogena na svježim proizvodima i hrani koja je spremna za konzumaciju više je rečeno u uvodu rada, gdje je istaknuto i znanstveno izvješće WHO/FAO. U navedenom izvješću djelomično je pojašnjen dio problema vezanog za kombinacije virusa i različite hrane s posebnim naglaskom na hranu koja je spremna za konzumaciju. Slično se navodi i u Tehničkom izvješću novozelandskog Ministarstva primarne industrije (MPI) „Paper no.: 2016/40 - Methods for virus detection in ready-to-eat (RTE) foods“, gdje se navode primjeri hrane koja je identificirana kao vektor u specifičnim virusnim trovanjima, a uključuje i salate od tjestenine i krumpira, pekarske proizvode, sendviče, polusušene rajčice i drugu delikatesnu hranu (Greening i sur., 2016). Spomenuto tehničko izvješće kroz rad virološkog istraživačkog programa za sigurnost hrane pri MPI dokumentira razvoj odgovarajuće metode za ispitivanje navedenih primjera matriksa, odnosno izravne Trizol metode s kratkim pročišćavanjem RNK uz pomoć kolona. Navedeni virološki istraživački program radi na osiguravanju dostupnih metoda za otkrivanje visoko prioriteta virusa koji se prenose hranom, NoV i HAV, u grupama hrane koje obično predstavljaju rizik i uzrokuju zabrinutost. Ističe se kako je potreban daljnji rad na validaciji i utvrđivanju granica detekcije i ponovljivosti prije nego što se metoda može koristiti za rutinsku analizu. Glavni cilj njihovog rada bio je razviti i testirati metode za otkrivanje norovirusa genogrupe I i II (NoV GI, GII) i virusa hepatitisa A (HAV) u različitim odabranim složenim matriksima RTE, a koji su već bili izvori trovanja NoV ili HAV. Dio hrane obuhvaćene radom, osim prije navedene hrane, uključivao je i salate od tjestenine, salate od kupusa, tvrde i meke sireve, narezanu šunku i glazuru za pekarske proizvode (Greening i sur., 2016). Izvješće daje kratki osvrt na razvoj metoda u posljednjih 20 godina te uvid na najznačajnije razvijene metode za analizu RTE i složene hrane, od kojih su između ostalih metode koje su razvili Gouvea i sur. (1994), Schwab i sur. (2000), Leggitt i Jaykus (2000), Rutjes i sur. (2006), Stals i sur. (2013) te

Girard i sur. (2013). U tim studijama opisuju se različite metode pri oporavku virusa koje uključuju izravnu izolaciju s Trizol reagensom (Schwab i sur., 2000), eluciju alkalnog pufera s ili bez homogenizacije, nakon čega slijede jedan ili dva koraka taloženja PEG (Leggitt i Jaykus, 2000; Baert i sur., 2008), eluciju neutralnog pufera poslije koje slijedi PEG taloženje ili ultracentrifugiranje i eluciju alkalnog pufera s ultrafiltracijom (Rutjes i sur., 2006; Greening i sur., 2016). U izvješću MPI navode kako se u novije vrijeme za oporavak mišjeg norovirusa (MNV) kao NoV surogata, iz nekoliko namirnica, uključujući pureća prsa i krumpir salatu, koristi magnetski silicij, ali i druge metode temeljene na silicijevom dioksidu (Greening i sur., 2016). Navedene metode najčešće su sadržavale korak ispiranja pomoću fluorougljikovih otapala kao što su Freon ili Vertrel. Metode oporavka virusa često su kombinirane s različitim postupcima izolacije i pročišćavanja RNK, nakon čega su ispitane RT-PCR metodom. Dobro je napomenuti kako je kvantitativni RT-PCR u stvarnom vremenu (RT-qPCR) korišten u tri od prethodno navedenih studija (Baert i sur., 2008; Stals i sur., 2013; Girard i sur., 2013), dok se u preostalim studijama koristio konvencionalni RT-PCR na bazi gela gdje je bilo moguće utvrditi gubitak, odnosno oporavak virusa razrjeđivanjem krajnje točke. Baert i sur. (2008), kroz svoja su istraživanja utvrdili da odabir metode posebno ovisi o prirodi i sastojcima u hrani, istaknuvši da se nekim metodama može postići visok oporavak virusa iz poljoprivrednih proizvoda, dok se u drugim bolji učinak izolacije postiže s hranom koja sadrži viši udio masti. Nadalje, ističu kako su inhibitori značajan problem u složenoj hrani te na kraju zaključuju da: što je metoda složenija i što je više potrebno koraka to je gubitak virusa veći (Baert i sur., 2008). Greening i sur. (2016), u svom izvješću ističu kako se metode koje koriste PEG taloženje, a takva metoda je korištena i za obradu uzoraka za potrebe ove studije, općenito sporije i zahtjevnije zbog koraka taloženja, što može rezultirati povećanim gubitkom virusa (Baert i sur., 2008). Zaključuju i kako je izravna Trizol metoda relativno brza i jednostavna za izvođenje, a od svih ispitanih metoda bila je najprikladnija metoda za obradu nekoliko uzoraka u seriji (Greening i sur., 2016). Važno je napomenuti kako je većina eksperimenata, uključujući i studiju Greening i sur., provedena korištenjem inokuluma s visokom količinom virusa, imajući u vidu činjenicu kako je pretpostavka da je infektivna doza za NoV poprilično niska (20 čestica) i da postoji mogućnost da te metode nisu dovoljno osjetljive za otkrivanje infektivne doze. U studiji se navedeno opisuje u primjeru ispitivanja 5 g porcije salate od tjestenine od 200 g koja sadrži 20 čestica, gdje bi u tom slučaju granica detekcije bila 1 čestica na 10 g tjestenine iz čega je jasno da postoji određeni rizik od lažno negativnih rezultata za hranu kontaminiranu s niskim razinama virusa. Osim toga ističu ono što je napomenuto i u ovoj studiji, a to je da molekularne

metode ne određuju infektivnost NoV ili HAV, već se otkrivanjem ovih virusa u hrani ukazuje tek na rizik od infekcije (Greening i sur., 2016).

Rezultate predstavljene u ovoj studiji, a dobivene ispitivanjem briseva i uzoraka gotove hrane, treba pažljivo promatrati i tumačiti. Prvenstveno, zato što je iznimno izazovno dokazati virusne čestice u malim količinama iz uzoraka za koje nema jamstva da su bili izravno izloženi izvoru ciljanog virusa. Ako se u taj kontekst stavi i hrana u smislu kompleksnih gotovih jela, taj problem znatno je izraženiji, djelomično i zbog činjenica istaknutih u studiji Jia i sur. (2022). Općenito govoreći, uspješna detekcija virusa u hrani veliki je izazov i zbog fizikalno-kemijskih svojstava hrane što uključuje različite matrice i heterogenu distribuciju virusnih čestica, nisko virusno opterećenje te vrlo zahtjevne postupke izolacije (Bosch i sur., 2018; Yépez-Gómez i sur., 2013), a radi čega treba biti svjestan potencijalno lažno negativnih rezultata ili podcijenjenih količina virusa.

Zbog povoljne temperature za preživljavanje virusa SARS-CoV-2 u hladnom lancu hrane, rezultati studije Zhang i sur. (2021) predlažu zanimljivo rješenje, ne samo za slučaj s aktualnim SARS-CoV-2 virusom već i kao model za sve buduće patogene koji bi mogli predstavljati ozbiljnu prijetnju javnom zdravlju. U studiji se predstavlja i predlaže model upotrebe interdigitalnih mikroelektrodnih čipova, modificiranih da sadržavaju sondu za antitijela i integracijom obogaćenja s dielektroforezom i očitavanjem međufaznog kapaciteta, kao strategiju za detekciju tragova spike-proteina iz SARS-CoV-2. Navedeni čipovi imaju nisku granicu detekcije od  $2,29 \times 10^{-6}$  ng/mL u 20 sekundi, sa širokim linearnim rasponom od  $10^{-5}$  –  $10^{-1}$  ng/mL i selektivnošću od 234:1. Cijena jednog testa može se svesti na ~ 1 dolar. Ovakva strategija mogla bi pružiti konkurentno rješenje za osjetljivu, selektivnu i masovnu primjenu u klasičnom hladnom lancu hrane i u stvarnom vremenu (Zhang i sur., 2021).



## 6. ZAKLJUČCI

1. Procjenom primjenjivosti i učinkovitosti najučinkovitijeg kita za izolaciju RNK, između četiri odabrana komercijalno dostupna kita, rezultati su pokazali da se kod nekih kitova korištenjem izopropanola, umjesto etanola, u koraku taloženja može postići veći prinos RNK.
2. Primjenjivost izdvojenog izolacijskog kita uspješno je potvrđena sudjelovanjem u međulaboratorijskom poredbenom ispitivanju i provedbom pilot ispitivanja prisutnosti virusa u okolišu, tj. na površinama.
3. Rezultati ispitivanja prisutnosti virusa SARS-CoV-2 na površinama u prostorima u kojima su boravili oboljeli sa slabo izraženim simptomima ili bez simptoma bolesti COVID-19 pokazali su da je značajan dio uzoraka (> 32 %) pozitivan na virusne čestice virusa SARS-CoV-2 na površinama. Ovakvi rezultati potvrdili su opravdanost sumnje da se slični rezultati mogu postići ako takve asimptomatske osobe ili osobe s manje izraženim simptomima rade u prehrambenom lancu.
4. Konačni rezultati ispitivanja prisutnosti virusa SARS-CoV-2 ili virusnih čestica na površinama pakiranja hrane, površinama hrane i hrani pokazali su da virus nije prisutan na ispitanim uzorcima.
5. Može se zaključiti da hrana, površina hrane i prehrambenih proizvoda ne predstavljaju značajan rizik od infekcije virusom SARS-CoV-2 uz napomenu da ta mogućnost postoji, ali je malo vjerojatna.
6. Preporučuje se sustavno praćenje virusa kako bi se dobio bolji uvid u dinamiku i mogućnosti prijenosa virusa hranom. Osim klasičnog monitoringa, moguće je uvesti inovativne tehnologije u smislu interdigitalnih mikroelektrodnih čipova.

## 7. LITERATURA

Aboubakr, H. A., Sharafeldin, T. A., Goyal, S. M. (2021) Stability of SARS-CoV-2 and other coronaviruses in the environment and on common touch surfaces and the influence of climatic conditions: A review. *Transbound Emerg Dis.*, **68**(2), 296–312.

Agilent (2020) Absolutely RNA Miniprep Kit Instruction Manual. Agilent-Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, <<https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/400800.pdf>>. Pristupljeno 13. srpnja 2022.

Ambrosi, C., Prezioso, C., Checconi, P., Scribano, D., Sarshar, M., Capannari, M., Tomino, C., Fini, M., Garaci, E., Palamara, A. T., De Chiara, G., Limongi, D. (2021) SARS-CoV-2: Comparative analysis of different RNA extraction methods. *J. Virol. Methods.*, **287**, 114008.

Anderson, R. M., Fraser, C., Ghani, A. C., Donnelly, C. A., Riley, S., Ferguson, N. M., Leung, G. M., Lam, T. H., Hedley, A. J. (2004) Epidemiology, transmission dynamics and control of SARS: the 2002–2003 epidemic. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, **359**(1447), 1091–1105.

Anelich, L. E. C. M., Lues, R., Farber, J. M., Parreira, V. R. (2020) SARS-CoV-2 and Risk to Food Safety. *Front Nutr.*, **7**, 580551.

ANSES (2020) ANSES OPINION on an urgent request to assess certain risks associated with COVID-19. ANSES-Agence Nationale Sécurité Sanitaire Alimentaire Nationale, Maisons-Alfort, <<https://www.anses.fr/fr/system/files/SABA2020SA0037-1EN.pdf>>. Pristupljeno 6. srpnja 2023.

Baert, L., Uyttendaele, M., Debevere, J. (2008) Evaluation of viral extraction methods on a broad range of Ready-To-Eat foods with conventional and real-time RT-PCR for Norovirus GII detection. *Int. J. Food Microbiol.*, **123**(1–2), 101–108.

Benussi-Skukan, A., Boroš, K., Brlek-Gorski, D., Grizelj, N., Hegedušić, P., Hengl, B., Humski, A., Karačić, T., Kovaček, I., Majić, K., Palčić-Jakopović, K., Putnik, P., Vazdar, R. (2011) Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu, 3. izmijenjeno izdanje. MPRRR-Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, <<http://veterinarstvo.hr/default.aspx?id=4548>>. Pristupljeno 17. studeni 2022.

BfR (2022) Can SARS-CoV-2 Be Transmitted Via Food And Objects?. BfR- Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, <<https://www.bfr.bund.de/cm/349/can-sars-cov-2-be-transmitted-via-food-and-objects.pdf>>. Pristupljeno 23. kolovoz 2022.

- Bosch, A., Gkogka, E., Le Guyader, F. S., Loisy-Hamon, F., Lee, A., van Lieshout, L., Marthi, B., Myrmel, M., Sansom, A., Schultz, A. C., Winkler, A., Zuber, S., Phister, T. (2018) Foodborne viruses: Detection, risk assessment, and control options in food processing. *Int. J. Food Microbiol.*, **285**, 110–128.
- Brunstein, J. (2015) Interpretation of qPCR curve shapes. *MLO Med Lab Obs.*, **47**(6), 38–40.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., Wittwer, C. T. (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.*, **55**(4), 611–622.
- CAC (2004) General Guidelines on Sampling CAC-GL-50. (str. 1–69). CAC-Codex Alimentarius Commission, Rim
- Cauchemez, S., Fraser, C., Van Kerkhove, M. D., Donnelly, C. A., Riley, S., Rambaut, A., Enouf, V., van der Werf, S., Ferguson, N. M. (2014) Middle East respiratory syndrome coronavirus: quantification of the extent of the epidemic, surveillance biases, and transmissibility. *Lancet Infect. Dis.*, **14**(1), 50–56.
- Ceylan, Z., Meral, R., Cetinkaya, T. (2020) Relevance of SARS-CoV-2 in food safety and food hygiene: potential preventive measures, suggestions and nanotechnological approaches. *VirusDisease*, **31**(2), 154–160.
- Chang, C., Hou, M.-H., Chang, C.-F., Hsiao, C.-D., Huang, T. (2014) The SARS coronavirus nucleocapsid protein – Forms and functions. *Antivir. Res.*, **103**, 39–50.
- Chan, K.-H., Sridhar, S., Zhang, R. R., Chu, H., Fung, A. Y.-F., Chan, G., Chan, J. F.-W., To, K. K.-W., Hung, I. F.-N., Cheng, V. C.-C., Yuen, K.-Y. (2020) Factors affecting stability and infectivity of SARS-CoV-2. *J. Hosp. Infect.*, **106**(2), 226–231.
- Cheung, K. S., Hung, I. F. N., Chan, P. P. Y., Lung, K. C., Tso, E., Liu, R., Ng, Y. Y., Chu, M. Y., Chung, T. W. H., Tam, A. R., Yip, C. C. Y., Leung, K. H., Fung, A. Y., Zhang, R. R., Lin, Y., Cheng, H. M., Zhang, A. J. X., To, K. K. W., Chan, K. H., Yuen, K. Y., Leung, W. K. (2020) Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples From a Hong Kong Cohort: Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology*, **159**(1), 81–95.

Chin, A. W. H., Chu, J. T. S., Perera, M. R. A., Hui, K. P. Y., Yen, H.-L., Chan, M. C. W., Peiris, M., Poon, L. L. M. (2020) Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *The Lancet Microbe*, **1**(1), e10.

Colaneri, M., Seminari, E., Novati, S., Asperges, E., Biscarini, S., Piralla, A., Percivalle, E., Cassaniti, I., Baldanti, F., Bruno, R., Mondelli, M. U., Bruno, R., Mondelli, M. U., Brunetti, E., Di Matteo, A., Seminari, E., Maiocchi, L., Zuccaro, V., Pagnucco, L., Ludovisi, S., Lissandrin, R., Parisi, A., Sacchi, P., Patruno, S. F. A., Michelone, G., Gulminetti, R., Zanaboni, D., Novati, S., Maserati, R., Orsolini, P., Vecchia M. (2020) Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 RNA contamination of inanimate surfaces and virus viability in a health care emergency unit. *Clin. Microbiol. Infect.*, **26**(8), 1094.e1-1094.e5.

Colaneri, M., Seminari, E., Piralla, A., Zuccaro, V., Di Filippo, A., Baldanti, F., Bruno, R., Mondelli, M. U. (2020) Lack of SARS-CoV-2 RNA environmental contamination in a tertiary referral hospital for infectious diseases in Northern Italy. *J. Hosp. Infect.*, **105**(3), 474–476.

Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M. L., Mulders, D. G., Haagmans, B. L., van der Veer, B., van den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J.-L., Ellis, J., Zambon, M., Peiris, M., Goossens, H., Reusken, C., Koopmans, M. P. G., Drosten, C. (2020) Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, **25**(3).

Cui, J., Li, F., Shi, Z.-L. (2019) Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.*, **17**(3), 181–192.

Delamater, P. L., Street, E. J., Leslie, T. F., Yang, Y. T., Jacobsen, K. H. (2019) Complexity of the Basic Reproduction Number ( $R_0$ ). *Emerg. Infect. Dis.*, **25**(1), 1–4.

Dong, E., Du, H., Gardner, L. (2020) An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *Lancet Infect Dis.*, **20**(5), 533–534.

Duda-Chodak, A., Lukasiewicz, M., Zięć, G., Florkiewicz, A., Filipiak-Florkiewicz, A. (2020) Covid-19 pandemic and food: Present knowledge, risks, consumers fears and safety. *Trends food sci. technol.*, **105**, 145–160.

Dyal, J. W., Grant, M. P., Broadwater, K., Bjork, A., Waltenburg, M. A., Gibbins, J. D., Hale, C., Silver, M., Fischer, M., Steinberg, J., Basler, C. A., Jacobs, J. R., Kennedy, E. D., Tomasi, S., Trout, D., Hornsby-Myers, J., Oussayef, N. L., Delaney, L. J., Patel, K., Shetty, V., Kline, K. E., Schroeder, B., Herlihy, R. K., House, J., Jervis, Rachel., Clayton, J. L., Ortbahn, D.,

Austin, C., Berl, E., Moore, Z., Buss, B. F., Stover, D., Westergaard, R., Pray, I., DeBolt, M., Person, A., Gabel, J., Kittle, T. S., Hendren, P., Rhea, C., Holsinger, C., Dunn, John., Turabelidze, G., Ahmed, F. S., deFijter, S., Pedati, C. S., Rattay, K., Smith, E. E., Luna-Pinto, C., Cooley, L. A., Saydah, S., Preacely, N. D., Maddox, R. A., Lundeen, E., Goodwin, B., Karpathy, S. E., Griffing, S., Jenkins, M. M., Lowry, G., Schwarz, R. D., Yoder, J., Peacock, G., Walke, H. T., Rose, D. A., Honein, M. A. (2020) COVID-19 Among Workers in Meat and Poultry Processing Facilities — 19 States, *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, **69**(18).

ECDC (2021) Distribution of confirmed cases of MERS-CoV by place of infection and month of onset. ECDC-European Centre for Disease Prevention and Control, Frösunda, <<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/distribution-confirmed-cases-mers-cov-place-infection-and-month-onset>>. Pristupljeno 2. srpnja 2023.

EFSA (2023) EFSA and COVID-19. EFSA-European Food Safety Authority, Parma, <<https://www.efsa.europa.eu/en/topics/efsa-and-covid-19>>. Pristupljeno 16. veljače 2023.

Eslami, H., Jalili, M. (2020) The role of environmental factors to transmission of SARS-CoV-2 (COVID-19). *AMB Express*, **10**(1), 92.

Eurofins (2020a) Validation Report VIRSeek SARS-CoV-2 Screen & VIRSeek SARS-CoV-2 Ident. Eurofins-Eurofins GeneScan Technologies GmbH, Freiburg, <<https://www.goldstandarddiagnostics.com/products/viruses.html>>. Pristupljeno 11. rujna 2022.

Eurofins (2020b) VIRSeek Food Murine Norovirus (MNV)/Process Control Real-time RT-PCR. Eurofins-Eurofins GeneScan Technologies GmbH, Freiburg, <[https://www.goldstandarddiagnostics.com/pub/media/productattachments/files/MNL\\_VIRSeek\\_MNV\\_Proc\\_Ctrl\\_real\\_time\\_RT\\_PCR\\_5728200401\\_5728200801\\_V4.pdf](https://www.goldstandarddiagnostics.com/pub/media/productattachments/files/MNL_VIRSeek_MNV_Proc_Ctrl_real_time_RT_PCR_5728200401_5728200801_V4.pdf)>. Pristupljeno 11. rujna 2022.

Eurofins (2020c) VIRSeek SARS-COV-2 Ident 2 ID 3507 V1. Eurofins-Eurofins GeneScan Technologies GmbH, Freiburg, <[https://www.goldstandarddiagnostics.es/media/9241/mnl\\_virseek\\_sars-cov-2\\_ident\\_2\\_5728200705\\_v1.pdf](https://www.goldstandarddiagnostics.es/media/9241/mnl_virseek_sars-cov-2_ident_2_5728200705_v1.pdf)>. Pristupljeno 11. rujna 2022.

Eurofins (2020d) VIRSeek SARS-COV-2 Mplex ID3592 V2. Eurofins-Eurofins GeneScan Technologies GmbH, Freiburg, <[https://www.goldstandarddiagnostics.com/pub/media/productattachments/files/MNL\\_VIRSeek\\_SARS\\_CoV-2\\_Mplex\\_5728201101\\_V2.pdf](https://www.goldstandarddiagnostics.com/pub/media/productattachments/files/MNL_VIRSeek_SARS_CoV-2_Mplex_5728201101_V2.pdf)>. Pristupljeno 11. rujna 2022.

Eurofins (2020e) VIRSeek SARS-COV-2 Screen ID 3454 V1. Eurofins-Eurofins GeneScan Technologies GmbH, Freiburg, <[https://www.goldstandarddiagnostics.es/media/7608/mnl\\_virseek\\_sars-cov-2\\_screen\\_5728200601\\_v1.pdf](https://www.goldstandarddiagnostics.es/media/7608/mnl_virseek_sars-cov-2_screen_5728200601_v1.pdf)>. Pristupljeno 11. rujna 2022.

Fehr, A. R., Perlman, S. (2015) Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis, *Methods Mol Biol.*, **1282**:1-23.

FDA (2023) Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). FDA-Food and Drug Administration, Silver Spring, <<https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/counterterrorism-and-emerging-threats/coronavirus-disease-2019-covid-19>>. Pristupljeno 6. srpnja 2023.

FSA (2020) Qualitative risk assessment on the risk of food or food contact materials as a transmission route for SARS-CoV-2. FSA-Food Standards Agency, London, <<https://www.food.gov.uk/print/pdf/node/4121>>. Pristupljeno 2. siječnja 2023.

FSANZ (2021) Novel Coronavirus and Food Safety. FSANZ-Food Standards Australia & New Zealand, Canberra, Australia, Wellington, New Zealand., <<https://www.foodstandards.gov.au/consumer/safety/Pages/NOVEL-CORONAVIRUS-AND-FOOD-SAFETY.aspx>>. Pristupljeno 6. srpnja 2023.

Girard, M., Morales-Rayas, R., Jean, J. (2013) Comparison of RNA Extraction Methods for the Detection of a Norovirus Surrogate in Ready-to-Eat Foods. *Foodborne Pathog. Dis.*, **10**(1), 47–54.

Green, M. R., Sambrook, J. (2017) Precipitation of DNA with Isopropanol. *Cold Spring Harbor Protoc.*, 2017(8), pdb.prot093385.

Greening, G., Hewitt, J., Hasell, S., Roger C. (2016) Methods for virus detection in ready-to-eat (RTE) foods. MPI-Ministry for Primary Industries, <<https://www.mpi.govt.nz/dmsdocument/12942-methods-for-virus-detection-in-ready-to-eat-rte-foods>>. Pristupljeno 11. siječnja 2023.

Guo, M., Tao, W., Flavell, R. A., Zhu, S. (2021) Potential intestinal infection and faecal-oral transmission of SARS-CoV-2. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*, **18**(4), 269–283.

Guo, Z.-D., Wang, Z.-Y., Zhang, S.-F., Li, X., Li, L., Li, C., Cui, Y., Fu, R.-B., Dong, Y.-Z., Chi, X.-Y., Zhang, M.-Y., Liu, K., Cao, C., Liu, B., Zhang, K., Gao, Y.-W., Lu, B., Chen, W. (2020) Aerosol and Surface Distribution of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Hospital Wards, Wuhan, China, 2020. *Emerg. Infect. Dis.*, **26**(7), 1583–1591.

Han, J., Zhang, X., He, S., Jia, P. (2021) Can the coronavirus disease be transmitted from food? A review of evidence, risks, policies and knowledge gaps. *Environ Chem Lett.*, **19**(1), 5–16.

Harrison, A. G., Lin, T., Wang, P. (2020) Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol.*, **41**(12), 1100–1115.

Herstein, J. J., Degarege, A., Stover, D., Austin, C., Schwedhelm, M. M., Lawler, J. V., Lowe, J. J., Ramos, A. K., Donahue, M. (2021) Characteristics of SARS-CoV-2 Transmission among Meat Processing Workers in Nebraska, USA, and Effectiveness of Risk Mitigation Measures. *Emerg. Infect. Dis.*, **27**(4), 1032–1038.

Hiscott, J., Alexandridi, M., Muscolini, M., Tassone, E., Palermo, E., Soultsioti, M., Zevini, A. (2020) The global impact of the coronavirus pandemic. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **53**, 1–9.

Hrdy, J., Vasickova, P. (2022) Virus detection methods for different kinds of food and water samples – The importance of molecular techniques. *Food Control*, **134**, 108764.

HRN EN ISO 4833-1:2013, Mikrobiologija u lancu hrane -- Horizontalna metoda za određivanje broja mikroorganizama -- 1. dio: Određivanje broja kolonija pri 30 °C tehnikom zalijeivanja podloge (ISO 4833-1:2013; EN ISO 4833-1:2013)

HRN EN ISO 6579-1:2017, Mikrobiologija u lancu hrane -- Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti, određivanje broja i serotipizaciju Salmonella -- 1. dio: Dokazivanje prisutnosti Salmonella spp. (ISO 6579-1:2017; EN ISO 6579-1:2017)

HRN EN ISO 6887-1:2017, Mikrobiologija u lancu hrane -- Priprema ispitnih uzoraka, osnovnog i ostalih decimalnih razrjeđenja za mikrobiološko ispitivanje -- 1. dio: Opća pravila za pripremu osnovnog i ostalih decimalnih razrjeđenja (ISO 6887-1:2017; EN ISO 6887-1:2017)

HRN EN ISO 6887-4:2017, Mikrobiologija u lancu hrane -- Priprema ispitnih uzoraka, osnovnog i ostalih decimalnih razrjeđenja za mikrobiološko ispitivanje -- 4. dio: Posebna pravila za pripremu raznih proizvoda (ISO 6887-4:2017; EN ISO 6887-4:2017)

HRN EN ISO 6888-2:2004, Mikrobiologija hrane i stočne hrane -- Horizontalni postupak brojenja koagulaza-pozitivnih stafilokoka (*Staphylococcus aureus* i druge vrste) -- 2. dio: Postupak primjene agara s fibrinogenom i plazmom kunića (ISO 6888-2:1999+Amd 1:2003; EN ISO 6888-2:1999+A1:2003)

HRN EN ISO 7218:2008, Mikrobiologija hrane i hrane za životinje -- Opći zahtjevi i upute za mikrobiološka ispitivanja (ISO 7218:2007; EN ISO 7218:2007)/HRN EN ISO 7218:2008/A1:2013 Mikrobiologija hrane i hrane za životinje -- Opći zahtjevi i upute za mikrobiološka ispitivanja (ISO 7218:2007/Amd 1:2013, ispravljena verzija 2014-04-15; EN ISO 7218:2007/A1:2013)

HRN EN ISO 7932:2005, Mikrobiologija hrane i stočne hrane -- Horizontalna metoda za brojenje *Bacillus cereus* -- Tehnika brojenja kolonija pri 30 oC (ISO 7932:2004; EN ISO 7932:2004)

HRN EN ISO 11290-1:2017, Mikrobiologija u lancu hrane -- Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja *Listeria monocytogenes* i drugih *Listeria* spp. -- 1. dio: Metoda dokazivanja prisutnosti (ISO 11290-1:2017; EN ISO 11290-1:2017)

HRN EN ISO 15216-2:2019, Mikrobiologija u lancu hrane -- Horizontalna metoda za određivanje virusa hepatitisa A i norovirusa upotrebom RT-PCR u stvarnom vremenu -- 2. dio: Metoda dokazivanja (ISO 15216-2:2019; EN ISO 15216-2:2019)

HRN EN ISO 21528-2:2017, Mikrobiologija u lancu hrane -- Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja *Enterobacteriaceae* -- 2. dio: Postupak određivanja broja kolonija (ISO 21528-2:2017, ispravljena verzija 2018-06-01; EN ISO 21528-2:2017).

HRN ISO 15213:2004, Mikrobiologija hrane i stočne hrane -- Horizontalna metoda za brojenje sulfitreducirajućih bakterija u anaerobnim uvjetima (ISO 15213:2003)

HRN ISO 21527-1:2012, Mikrobiologija hrane i hrane za životinje -- Horizontalna metoda za brojenje kvasaca i plijesni -- 1. dio: Tehnika brojenja kolonija u proizvodima s aktivitetom vode većim od 0,95 (ISO 21527-1:2008)

HRN ISO 21807:2005, Mikrobiologija hrane i stočne hrane -- Određivanje aktiviteta vode (ISO 21807:2004)

HRS CEN ISO/TS 15216-2:2013, Mikrobiologija hrane i hrane za životinje -- Horizontalna metoda za određivanje virusa hepatitisa A i norovirusa u hrani upotrebom RT-PCR u stvarnom vremenu -- 2. dio: Metoda za kvalitativno određivanje (ISO/TS 15216-2:2013, ispravljena verzija 2013-05-01; CEN ISO/TS 15216-2:2013)



HRS CEN ISO/TS 17728:2015 Mikrobiologija u lancu hrane -- Postupci uzorkovanja za mikrobiološka ispitivanja uzoraka hrane i hrane za životinje (ISO/TS 17728:2015; CEN ISO/TS 17728:2015)

Huang, N., Pérez, P., Kato, T., Mikami, Y., Okuda, K., Gilmore, R. C., Conde, C. D., Gasmi, B., Stein, S., Beach, M., Pelayo, E., Maldonado, J. O., Lafont, B. A., Jang, S.-I., Nasir, N., Padilla, R. J., Murrah, V. A., Maile, R., Lovell, W., Wallet, S. M., Bowman, N. M., Meinig, S. L., Wolfgang, M. C., Choudhury, S. N., Novotny, M., Aevermann, B. D., Scheuermann, R. H., Cannon, G., Anderson, C. W., Lee, R. E., Marchesan, J. T., Bush, M., Freire, M., Kimple, A. J., Herr, D. L., Rabin, J., Grazioli, A., Das, S., French, B. N., Pranzatelli, T., Chiorini, J. A., Kleiner, D. E., Pittaluga, S., Hewitt, S. M., Burbelo, P. D., Chertow, D., NIH COVID-19 Autopsy Consortium, Byrd, K. M., Sequeira, I., Warner, B. M., Teichmann, S. A., Freire, M., Kimple, A. J., Frank, K., Lee, J., Boucher, R. C., Teichmann, S. A., Warner, B. M., Byrd, K. M. (2021) SARS-CoV-2 infection of the oral cavity and saliva. *Nat. Med.*, **27**(5), 892–903.

Jalava, K. (2020) First respiratory transmitted food borne outbreak? *Int. J. Hyg. Environ. Health.*, **226**, 113490.

Jia, M., Taylor, T. M., Senger, S. M., Ovissipour, R., Bertke, A. S. (2022) SARS-CoV-2 Remains Infectious on Refrigerated Deli Food, Meats, and Fresh Produce for up to 21 Days. *Foods*, **11**(3), 286.

JHU/CSSE (2023) COVID-19 Dashboard. JHU- Johns Hopkins University i CSSE-Center for Systems Science and Engineering, Baltimore, <<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>>. Pristupljeno 14. veljače 2023.

Kampf, G., Pfaender, S., Goldman, E., Steinmann, E. (2021) SARS-CoV-2 Detection Rates from Surface Samples Do Not Implicate Public Surfaces as Relevant Sources for Transmission. *Hygiene*, **1**(1), 24–40.

Khan, S., Tombuloglu, H., Hassanein, S. E., Rehman, S., Bozkurt, A., Cevik, E., Abdel-Ghany, S., Nabi, G., Ali, A., Sabit, H. (2020) Coronavirus diseases 2019: Current biological situation and potential therapeutic perspective. *Eur. J. Pharmacol.*, **886**, 173447.

Ksiazek, T. G., Erdman, D., Goldsmith, C. S., Zaki, S. R., Peret, T., Emery, S., Tong, S., Urbani, C., Comer, J. A., Lim, W., Rollin, P. E., Dowell, S. F., Ling, A.-E., Humphrey, C. D., Shieh, W.-J., Guarner, J., Paddock, C. D., Rota, P., Fields, B., DeRisi, J., Yang, J.-Y., Cox, N., Hughes,

- J. M., LeDuc, J. W., Bellini, W. J., Anderson, L. J. (2003) A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. *N. Engl. J. Med.*, **348**(20), 1953–1966.
- Kubina, R., Dziedzic, A. (2020) Molecular and Serological Tests for COVID-19. A Comparative Review of SARS-CoV-2 Coronavirus Laboratory and Point-of-Care Diagnostics. *Diagnostics*, **10**(6), 434.
- Kutter, J. S., Spronken, M. I., Fraaij, P. L., Fouchier, R. A., Herfst, S. (2018) Transmission routes of respiratory viruses among humans. *Curr Opin Virol.*, **28**, 142–151.
- Lai, M. M. C., Cavanagh, D. (1997) The Molecular Biology of Coronaviruses. *Adv Virus Res.*, **48**:1-100.
- Leggitt, P. R., Jaykus, L.-A. (2000) Detection Methods for Human Enteric Viruses in Representative Foods. *J. Food Prot.*, **63**(12), 1738–1744.
- Lever, M. A., Torti, A., Eickenbusch, P., Michaud, A. B., Å anti-Temkiv, T., JÃ ,rgensen, B. B. (2015) A modular method for the extraction of DNA and RNA, and the separation of DNA pools from diverse environmental sample types. *Front Microbiol.*, **6**:476.
- LGC (2021) Hygiene Surface Monitoring (HYGIENE) Individual Report - Round: HY295, Lab ID: HY0563. LGC-LGC Standards Proficiency Testing, Bury, <<https://portal.lgcstandards.com/historic-reports>>. Pristupljeno 11. siječnja 2021.
- Liu, R., Fu, A., Deng, Z., Li, Y., Liu, T. (2020) Promising methods for detection of novel coronavirus SARS-CoV-2. *View*, **1**(1):e4.
- Mlinar, Z., Kostelac, D., Kovaček, I., Klobučar, A., Tešić, V., Prahin, V., Frece, J. (2023) Investigation of SARS-CoV-2 Detection Method Applicability and Virus Occurrence in Food and Food Packaging. *Food Technol Biotechnol.*, **61**(2), 250–258.
- Mondelli, M. U., Colaneri, M., Seminari, E. M., Baldanti, F., Bruno, R. (2021) Low risk of SARS-CoV-2 transmission by fomites in real-life conditions. *Lancet Infect. Dis.*, **21**(5), e112.
- Neuman, B. W., Adair, B. D., Yoshioka, C., Quispe, J. D., Orca, G., Kuhn, P., Milligan, R. A., Yeager, M., Buchmeier, M. J. (2006) Supramolecular Architecture of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Revealed by Electron Cryomicroscopy. *Virol*, **80**(16), 7918–7928.
- Neuman, B. W., Kiss, G., Kunding, A. H., Bhella, D., Baksh, M. F., Connelly, S., Droese, B., Klaus, J. P., Makino, S., Sawicki, S. G., Siddell, S. G., Stamou, D. G., Wilson, I. A., Kuhn, P.,

Buchmeier, M. J. (2011) A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *J. Struct. Biol.*, **174**(1), 11–22.

NMKL (2014) Procedure 12 Guide on sampling for analysis of foods, 2. ed. NMKL-Nordic Committee on Food Analysis.

O'Brien, M., Rundell, Z. C., Nemeč, M. D., Langan, L. M., Back, J. A., Lugo, J. N. (2021) A comparison of four commercially available RNA extraction kits for wastewater surveillance of SARS-CoV-2 in a college population. *Sci. Total Environ.*, **801**, 149595.

ODNI (2023) Report on Potential Links Between the Wuhan Institute of Virology and the Origins of COVID 19 20230623. ODNI-Office of the Director of National Intelligence, Washington, <<https://www.dni.gov/index.php/newsroom/reports-publications>>. Pristupljeno 26. lipnja 2023.

Ong, S. W. X., Tan, Y. K., Chia, P. Y., Lee, T. H., Ng, O. T., Wong, M. S. Y., Marimuthu, K. (2020) Air, Surface Environmental, and Personal Protective Equipment Contamination by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) From a Symptomatic Patient. *JAMA*, **323**(16), 1610 -1612.

Pal, M., Berhanu, G., Desalegn, C., Kandi, V. (2020) Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2): An Update. *Cureus.*, **12**(3):e7423.

Pedreira, A., Taşkın, Y., García, M. R. (2021) A Critical Review of Disinfection Processes to Control SARS-CoV-2 Transmission in the Food Industry. *Foods*, **10**(2), 283.

Peeri, N. C., Shrestha, N., Rahman, M. S., Zaki, R., Tan, Z., Bibi, S., Baghbanzadeh, M., Aghamohammadi, N., Zhang, W., Haque, U. (2020) The SARS, MERS and novel coronavirus (COVID-19) epidemics, the newest and biggest global health threats: what lessons have we learned? *Int. J. Epidemiol.*, **49**(3), 717–726.

Pekar, J. E., Magee, A., Parker, E., Moshiri, N., Izhikevich, K., Havens, J. L., Gangavarapu, K., Malpica Serrano, L. M., Crits-Christoph, A., Matteson, N. L., Zeller, M., Levy, J. I., Wang, J. C., Hughes, S., Lee, J., Park, H., Park, M.-S., Ching Zi Yan, K., Lin, R. T. P., Isa M. N. M., Noor, Y. M., Vasylyeva, T. I., Garry, R. F., Holmes E. C., Rambaut, A., Suchard, M. A., Andersen, K. G., Worobey, M., Wertheim, J. O. (2022) The molecular epidemiology of multiple zoonotic origins of SARS-CoV-2. *Science*, **377**(6609), 960–966.

Peng, S., Li, G., Lin, Y., Guo, X., Xu, H., Qiu, W., Zhu, H., Zheng, J., Sun, W., Hu, X., Zhang, G., Li, B., Pathak, J. L., Bi, X., Dai, J. (2023) Stability of SARS-CoV-2 in cold-chain transportation environments and the efficacy of disinfection measures. *Front Cell Infect Microbiol.*, **13**, 1170505.

Petrović, T., D'Agostino, M. (2016) Chapter 5 - Viral Contamination of Food. U: *Antimicrobial Food Packaging: Viral Contamination of Food*, 1. izd. [online], (Velazquez. J. B., ured.), Academic Press, str. 65–79, <<https://www.sciencedirect.com/book/9780128007235/antimicrobial-food-packaging#book-description>>. Pristupljeno 11. rujna 2022.

Pitol, A. K., Julian, T. R. (2021) Community Transmission of SARS-CoV-2 by Surfaces: Risks and Risk Reduction Strategies. *Environ. Sci.*, **8**(3), 263–269.

Pung, R., Chiew, C. J., Young, B. E., Chin, S., Chen, M. I.-C., Clapham, H. E., Cook, A. R., Maurer-Stroh, S., Toh, M. P. H. S., Poh, C., Low, M., Lum, J., Koh, V. T. J., Mak, T. M., Cui, L., Lin, R. V. T. P., Heng, D., Leo, Y.-S., Lye, D. C., Lee, V. J. M., Singapore 2019 Novel Coronavirus Outbreak Research Team (2020) Investigation of three clusters of COVID-19 in Singapore: implications for surveillance and response measures. *Lancet*, **395**(10229), 1039–1046.

Rabenau, H. F., Cinatl, A. J., Morgenstern, A. B., Bauer, A. G., Preiser, W., Doerr, A. H. W. (2005) Stability and inactivation of SARS coronavirus. *Med Microbiol Immunol.*, **194**(1-2):1-6.

Rajapaksha, P., Elbourne, A., Gangadoo, S., Brown, R., Cozzolino, D., Chapman, J. (2019) A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms. *The Analyst*, **144**(2), 396–411.

Rajpal, V. R., Sharma, S., Sehgal, D., Singh, A., Kumar, A., Vaishnavi, S., Tiwari, M., Bhalla, H., Goel, S., Raina, S. N. (2022) A comprehensive account of SARS-CoV-2 genome structure, incurred mutations, lineages and COVID-19 vaccination program. *Future Virol.*, **17**(9), 687–706.

Ransom, E. M., Potter, R. F., Wallace, M. A., Mitchell, K. F., Yarbrough, M. L., Burnham, C. A. D., Anderson, N. W., Parikh, B. A. (2020) Comparison of extraction methods and thermocyclers for SARS-CoV-2 molecular detection using clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, **58**(10).

Reimund, E. (1987) Butylated hydroxytoluene, lipid-enveloped viruses, and AIDS. *Med. Hypotheses.*, **23**(1), 39–42.

Riddell, S., Goldie, S., Hill, A., Eagles, D., Drew, T. W. (2020) The effect of temperature on persistence of SARS-CoV-2 on common surfaces. *Viol. J.*, **17**(1), 145.

Rutjes, S. A., Lodder-Verschoor, F., Van Der Poel, W. H. M., Van Duijnhoven, Y. T. H. P., De Roda Husman, A. M. (2006) Detection of Noroviruses in Foods: A Study on Virus Extraction Procedures in Foods Implicated in Outbreaks of Human Gastroenteritis. *J. Food Prot.*, **69**(8), 1949–1956.

Sahin, A. R. (2020) 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) Outbreak: A Review of the Current Literature. *EJMO.*, **4**(1): 1-7

Sanche, S., Lin, Y. T., Xu, C., Romero-Severson, E., Hengartner, N., Ke, R. (2020) High Contagiousness and Rapid Spread of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Emerg. Infect. Dis.*, **26**(7), 1470–1477.

Santos, N., Vera, G. (1994) Improved method for purification of viral RNA from fecal specimens for rotavirus detection. *J. Virol. Methods.*, **46**(1), 11–21.

Schmittgen, T. D., Livak, K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.*, **3**(6), 1101–1108.

Schwab, K. J., Neill, F. H., Fankhauser, R. L., Daniels, N. A., Monroe, S. S., Bergmire-Sweat, D. A., Estes, M. K., Atmar, R. L. (2000) Development of methods to detect „Norwalk-like viruses“ (NLVs) and hepatitis A virus in delicatessen foods: Application to a food-borne NLV outbreak. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**(1), 213–218.

NCIRD/CDC (2021) Science Brief: SARS-CoV-2 and Surface (Fomite) Transmission for Indoor Community Environments. NCIRD/CDC-National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Division of Viral Diseases i Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/more/science-and-research/surface-transmission.html>>. Pristupljeno 27. siječnja 2023.

Shen, L., Cui, S., Zhang, D., Lin, C., Chen, L., Wang, Q. (2021) Comparison of four commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19 in China. *J. Clin. Lab. Anal.*, **35**(1): e23605.

SCDC (2020) COVID-19 virus found in imported frozen chicken wings. SCDC- Shenzhen Center of Disease Control and Prevention, Shenzhen,

[http://www.sz.gov.cn/en\\_szgov/news/notices/content/post\\_8000285.html](http://www.sz.gov.cn/en_szgov/news/notices/content/post_8000285.html)>. Pristupljeno 5. svibnja 2022.

Singh, M., Sadat, A., Abdi, R., Colaruotolo, L. A., Francavilla, A., Petker, K., Nasr, P., Moraveji, M., Cruz, G., Huang, Y., Arora, A., Chao, A., Walker, S., Wang, X., Rathnayake, S., Ragupathy, S., Newmaster, S. G., Hanner, R. H., Goodridge, L. D., Corradini, M. G. (2021) Detection of SARS-CoV-2 on surfaces in food retailers in Ontario. *CRFS*, **4**, 598–602.

Stals, A., Uyttendaele, M., Coillie, E. Van. (2013) The Need for Harmonization in Detection of Human Noroviruses in Food. *J. AOAC Int.*, **96**(5), 998–1005.

Tombuloglu, H., Sabit, H., Al-Suhaimi, E., Al Jindan, R., Alkharsah, K. R. (2021) Development of multiplex real-time RT-PCR assay for the detection of SARS-CoV-2. *PLoS One.*, **16**(4), e0250942.

Untoro, Y. M., Sucipto, T. H., Setyawati, H., Churrotin, S., Amarullah, I. H., Wardhani, P., Aryati, A., Ueda, S., Soegijanto, S. (2018) RNA Isolation of Dengue Virus Type 2 with Different Precipitation Solvents : Methanol, Chloroform, and 2-Isopropanol. *J.Ris.Kim.*, **3**(1), 52.

van Kasteren, P. B., van der Veer, B., van den Brink, S., Wijsman, L., de Jonge, J., van den Brandt, A., Molenkamp, R., Reusken, C. B. E. M., Meijer, A. (2020) Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19. *J. Clin. Virol.*, **128**, 104412.

Waltenburg, M. A., Rose, C. E., Victoroff, T., Butterfield, M., Dillaha, J. A., Heinzerling, A., Chuey, M., Fierro, M., Jarvis, R. H., Fedak, K. M., Leapley, A., Gabel, J. A., Feldpausch, A., Dunne, E. M., Austin, C., Pedati, C. S., Ahmed, F. S., Tubach, S., Rhea, C., Tonzel, J., Krueger, A., Crum, D. A., Vostok, J., Moore, M. J., Kempfer, H., Scheftel, J., Turabelidze, G., Stover, D., Donahue, M., Thomas, D., Edge, K., Gutierrez, B., Berl, E., McLafferty, M., Kline, K. E., Martz, N., Rajotte, J. C., Julian, E., Diedhiou, A., Radcliffe, R., Clayton, J. L., Ortbahn, D., Cummins, J., Barbeau, B., Carpenter, S., Pringle, J. C., Murphy, J., Darby, B., Graff, N. R., Dostal, T. K. H., Pray, I. W., Tillman, C., Rose, D. A., Honein, M. A., CDC COVID-19 Emergency Response Team (2021) Coronavirus Disease among Workers in Food Processing, Food Manufacturing, and Agriculture Workplaces. *Emerg. Infect. Dis.*, **27**(1), 243–249.

Warnes, S. L., Little, Z. R., Keevil, C. W. (2015) Human Coronavirus 229E Remains Infectious on Common Touch Surface Materials. *mBio.*, **6**(6):e01697-15

WHO (2020a) COVID-19 and food safety: guidance for food businesses. WHO-World Health Organization, Ženeva, <<https://www.who.int/publications/i/item/covid-19-and-food-safety-guidance-for-food-businesses>>. Pristupljeno 17. listopada 2022.

WHO (2020b) Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, WHO-World Health Organization, Ženeva, <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/331501>>. Pristupljeno 13. srpnja 2020.

WHO (2020c) Modes of transmission of virus causing COVID-19: implications for IPC precaution recommendations. WHO-World Health Organization, Ženeva, <<https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/modes-of-transmission-of-virus-causing-covid-19-implications-for-ipc-precaution-recommendations>>. Pristupljeno 2. kolovoza 2022.

WHO (2020d) Transmission of SARS-CoV-2: implications for infection prevention precautions. WHO-World Health Organization, Ženeva, <<https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/transmission-of-sars-cov-2-implications-for-infection-prevention-precautions>>. Pristupljeno 2. kolovoza 2022.

WHO (2020e) A practical “how to” protocol for health care and public health professionals. WHO-World Health Organization, Ženeva, <<https://www.jstor.org/stable/resrep27977>>. Pristupljeno 23. svibnja 2022.

WHO (2022) Middle East respiratory syndrome: global summary and assessment of risk - 16 November 2022. WHO-World Health Organization, Ženeva, <<https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MERS-RA-2022.1>>. Pristupljeno 23. svibnja 2022.

WHO (2023) Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. WHO-World Health Organization, Ženeva, <<https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-probable-sars-cases-with-onset-of-illness-from-1-november-2002-to-31-july-2003>>. Pristupljeno 5. svibnja 2023.

WHO/FAO (2008) Viruses in food: scientific advice to support risk management activities: meeting report. WHO-World Health Organization, Ženeva, FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rim, <[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44030/9789241563772\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44030/9789241563772_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>. Pristupljeno 27. siječnja 2022.

Worobey, M., Levy, J. I., Serrano, L. M., Crits-Christoph, A., Pekar, J. E., Goldstein, S. A., Rasmussen, A. L., Kraemer, M. U. G., Newman, C., Koopmans, M. P. G., Suchard, M. A., Wertheim, J. O., Lemey, P., Robertson, D. L., Garry, R. F., Holmes, E. C., Rambaut, A., Andersen, K. G. (2022) The Huanan Seafood Wholesale Market in Wuhan was the early epicenter of the COVID-19 pandemic. *Science*, **377**(6609):951-959.

Wu, S., Wang, Y., Jin, X., Tian, J., Liu, J., Mao, Y. (2020) Environmental contamination by SARS-CoV-2 in a designated hospital for coronavirus disease 2019. *Am J Infect Control.*, **48**(8), 910–914.

Xiling, G., Yin, C., Ling, W., Xiaosong, W., Jingjing, F., Fang, L., Xiaoyan, Z., Yiyue, G., Ying, C., Lunbiao, C., Liubo, Z., Hong, S., Yan, X. (2021) In vitro inactivation of SARS-CoV-2 by commonly used disinfection products and methods. *Sci. Rep.*, **11**(1), 2418.

Ye, G., Lin, H., Chen, S., Wang, S., Zeng, Z., Wang, W., Zhang, S., Rebmann, T., Li, Y., Pan, Z., Yang, Z., Wang, Y., Wang, F., Qian, Z., Wang, X. (2020) Environmental contamination of SARS-CoV-2 in healthcare premises. *J. Infect.*, **81**(2), e1–e5.

Yekta, R., Vahid-Dastjerdi, L., Norouzbeigi, S., Mortazavian, A. M. (2021) Food products as potential carriers of SARS-CoV-2. *Food Control*, **123**, 107754.

Yépiz-Gómez, M. S., Gerba, C. P., Bright, K. R. (2013) Survival of Respiratory Viruses on Fresh Produce. *Food Environ Virol.*, **5**(3), 150–156.

Zhang, J., Fang, X., Mao, Y., Qi, H., Wu, J., Liu, X., You, F., Zhao, W., Chen, Y., Zheng, L. (2021) Real-time, selective, and low-cost detection of trace level SARS-CoV-2 spike-protein for cold-chain food quarantine. *npj Sci Food*, **5**(1), 12.

Zhang, Y., Li, H., Shang, S., Meng, S., Lin, T., Zhang, Y., Liu, H. (2021) Evaluation validation of a qPCR curve analysis method and conventional approaches. *BMC Genom.*, **22**(S5), 680.

Zhang, Y., Pan, Y., Zhao, X., Shi, W., Chen, Z., Zhang, S., Liu, P., Xiao, J., Tan, W., Wang, D., Liu, W. J., Xu, W., Wang, Q., Wu, G. (2020) Genomic characterization of SARS-CoV-2 identified in a reemerging COVID-19 outbreak in Beijing’s Xinfadi market in 2020. *Biosaf Health.*, **2**(4), 202–205.

Zhou, J., Otter, J. A., Price, J. R., Cimpeanu, C., Meno Garcia, D., Kinross, J., Boshier, P. R., Mason, S., Bolt, F., Holmes, A. H., Barclay, W. S. (2021) Investigating Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Surface and Air Contamination in an



Acute Healthcare Setting During the Peak of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pandemic in London. *Clin. Infect. Dis.*, **73**(7), e1870–e1877.

Zhu, H., Wei, L., Niu, P. (2020) The novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *Glob. Health Res. Policy.*, **5**(1), 6.

Zdenko Mlinar rođen je 1983. godine u Banja Luci. Diplomirao je 2011. godine na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu, smjer Sanitarno inženjerstvo te stekao titulu magistra sanitarnog inženjerstva. Na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2019. godine završava Poslijediplomski sveučilišni studij Kvaliteta i sigurnost hrane i stječe akademski naziv sveučilišni specijalist kvalitete i sigurnosti hrane. Dodatna znanja usvaja kroz edukacije na području sigurnosti i kvalitete hrane, upravljanja rizicima, ustrojstva inspekcijskih tijela i dr. Od 2008. godine radi u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „dr. Andrija Štampar“ kao zdravstveni djelatnik u Službi za zaštitu okoliša i zdravstvenu ekologiju, odnosno u Odjelu za mikrobiološke analize hrane, predmeta opće upotrebe i okolišnih uzoraka gdje 2020. godine postaje voditelj Laboratorija za mikrobiološke analize hrane. Osim poslova ispitivanja namirnica metodama kultivacije i molekularnim metodama, radi kao predstavnik osiguranja kvalitete te kao zamjenik voditelja odjela. Dodatno je radio u Odjelu za sustave sigurnosti hrane i zdravstveni odgoj Službe za epidemiologiju na obrazovanju osoba koje rade u proizvodnji i distribuciji hrane te implementacije, revizije i monitoringa HACCP-sustava kao i na pripremi, validaciji i akreditaciji različitih mikrobioloških metoda za ispitivanje i uzorkovanje hrane te je sudjelovao u provedbi brojnih projekata i monitoringa u suradnji s različitim ministarstvima, zavodima i agencijama. Bio je član radne skupine Ministarstva zaštite okoliša i energetike za izradu Zakona o zaštiti od svjetlosnog onečišćenja i pripadajućih Pravilnika te je pri Ministarstvu poljoprivrede 2018. godine postao član radne skupine - Codex Alimentarius (CCFH), a 2023. godine član Povjerenstva za izradu Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu. Godine 2019. postao je član Hrvatskog mikrobiološkog društva. Na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu 2013. godine izabran je u nastavno zvanje asistenta gdje sudjeluje u izvođenju nastave kolegija „Mikrobiološka analiza hrane“ i „HACCP sustav“. Bio je predavač na seminaru Europskog centra za laboratorijsku izvrsnost i Hrvatskog mjeriteljskog društva te je sudjelovao u TAIEX misiji. Aktivno sudjeluje na domaćim i međunarodnim kongresima o sigurnosti i kvaliteti hrane, piše znanstvene, stručne i popularno-znanstvene radove i članke za različite časopise. U Hrvatskoj komori zdravstvenih radnika obnašao je dužnost delegata za djelatnost sanitarnog inženjerstva.

Popis znanstvenih radova objavljenih u časopisu indeksiranom u CC ili SCI:

Znanstveni radovi skupine A1:

Mlinar, Z., Kostelac, D., Kovaček, I., Klobučar, A., Tešić, V., Prahin, V., Frece, J. (2023) Investigation of SARS-CoV-2 Detection Method Applicability and Virus Occurrence in Food and Food Packaging. *Food Technol Biotechnol.*, **61**(2), 250–258. IF=2.400 (Q2)

Znanstveni radovi skupine A3:

Jagić, L., Mlinar, Z., Prahin, V., Vasiljević, A. & Kovaček, I. (2022) Examination of sprouts for the presence of STEC using the polymerase chain reaction method in real-time (real-time PCR). Abstracts of the 4th International Congress on Food Safety and Quality “One Health” (Kolarić, B., Krivohlavek, A., Bošnjir, J. Šikić, S., ur.), *Arh Hig Rada Toksikol.*, **73**(Suppl. 1). Dubrovnik, Hrvatska, str. 35-49.

Kovaček, I., Vasiljević, A., Findrik, K. & Mlinar, Z. (2022) Forgotten pathogen. The Book of Abstracts of the 6th International Conference on Metrology in Food and Nutrition (Jakovcic, M., Sikic, S. Fernandes-Whaley, M., ur.). Dubrovnik, Hrvatska, str. 59.

Mlinar, Z., Kovaček, I., Prahin, V. (2022) Ispitivanje svježeg porcioniranog pilećeg mesa u maloprodaji na prisutnost *Listeria monocytogenes*. Zbornik radova „Peradarski dani 2022.“ (Balenović, M., ur.), XIV. Simpozij Peradarski dani 2022. s međunarodnim sudjelovanjem. Poreč, Hrvatska, str. 223-229.

Kovaček, I., Mlinar, Z. Bogdan, V. (2021) Review of testing for foreign horse and pig DNA in meats in Croatia. 61st International Meat Industry Conference (Meatcon 2021). *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* **854** 012046. Zlatibor, Srbija.

Kovaček, I., Majić, I., Šušnjara, V., Mlinar, Z., Findrik, K., Vasiljević, A., Bogdan, V. (2021) Ispitivanje naftalana s obzirom na mikrobiološke kriterije. Zbornik radova XXV. Znanstveno - stručni skup "Voda i javna vodoopskrba" (Ujević, M., ur.). NP Plitvička jezera, Hrvatska, str. 75-79.

Mlinar, Z., Kovaček, I., Bogdan, V. (2021) Uspostava metode za otkrivanje SARS-CoV-2 u zraku. Zbornik sažetaka - Dvanaesti hrvatski znanstveno-stručni skup "Zaštita zraka '21" (Pehnc, G., ur.). Medulin, Hrvatska, str. 121.

Vasiljević, A., Kovaček, I., Mlinar, Z. & Bogdan Vesna (2020) Presence of sulfite-reducing Clostridia in bee pollen. Abstracts of the 3rd International Congress on Food Safety and Quality

“Food, Health and Climate Changes” (Šostar, Z., Šikić, S., Krivohlavek, A. Bošnjir, J., ur.), *Arh Hig Rada Toksikol.*, **71**(Suppl.1). Zagreb, Hrvatska, str. 49-52.

Tarbuk, A., Kovaček, I., Čorak, I., Meheš, I., Vasiljević, A., Grgić, K., Mlinar, Z., Draczynski, Z. (2019) The influence of cationic surfactant desorption to cotton antimicrobial properties. (Krućinska, I., ur.), 10th Central European conference Fibre grade polymers, chemical fibres and special textiles. Łódź, Poljska.

Mlinar, Z., Kovaček, I., Vasiljević, A. & Prahin Vedran (2019) Ispitivanje prisutnosti *Salmonella* spp. u uzorcima svježeg porcioniranog pilećeg mesa u maloprodaji. Zbornik radova „Peradarski dani 2019.“ (Balenović, M., ur.), XIII. Simpozij Peradarski dani 2019. s međunarodnim sudjelovanjem. Poreč, Hrvatska, str. 155-158.

Vasiljević, A., Landeka, V., Findrik, K., Kovaček, I. & Mlinar, Z. (2018) The importance of testing for bacteria of the genus *Listeria* in environmental samples. Abstracts of the 2nd International Congress on Food Safety and Quality “Food Life Cycle” (Šostar, Z., Šikić, S. Krivohlavek, A., ur.), *Arh Hig Rada Toksikol.*, **69**(Suppl. 1). Opatija, Hrvatska, str. 55-57.

Kovaček, I. & Mlinar, Z. (2018) Microbiological contamination in fresh squeezed juices. Abstracts of the 2nd International Congress on Food Safety and Quality “Food Life Cycle” (Šostar, Z., Šikić, S. Krivohlavek, A., ur.), *Arh Hig Rada Toksikol.*, **69**(Suppl. 1). Opatija, Hrvatska, str. 34-36.

Kovaček, I., Mlinar, Z. & Pavličević, N. (2017) PCR in detection of *Listeria monocytogenes*. Abstracts of the Food Safety and Quality Congress with international participation “New Achievements and Future Challenges” (Šostar, Z., ur.), *Arh Hig Rada Toksikol.*, **73**(Suppl. 1). Opatija, Hrvatska, str. 56-60.

Kovaček, I., Mlinar, Z. & Pavličević, N. (2016) Detection of Food-borne Pathogens: *Listeria monocytogenes* by using polymerase chain reaction. Book of Abstract „6th Croatian Congress of Microbiology“ (Antolović, R. Kifer, D., ur.). Sveti Martin na Muri, Hrvatska.