

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2011-1/244

ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	J4-9683
Naslov projekta	Molekularna in imunološka analiza slovenskih izolatov virusa aviarne influence H5N1
Vodja projekta	8023 Olga Zorman Rojs
Tip projekta	J Temeljni projekt
Obseg raziskovalnih ur	3.150
Cenovni razred	C
Trajanje projekta	07.2007 - 06.2010
Nosilna raziskovalna organizacija	406 Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	481 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
Družbeno-ekonomski cilj	13. Splošni napredek znanja - RiR financiran iz drugih virov (ne iz splošnih univerzitetnih fondov - SUF)

1.1. Družbeno-ekonomski cilj¹

Šifra	08.
Naziv	Kmetijstvo

2. Sofinancerji²

1.	Naziv	
	Naslov	
2.	Naziv	
	Naslov	
3.	Naziv	
	Naslov	

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Poročilo o realizaciji programa raziskovalnega projekta³

Aviarna influenza, ki jo povzročajo visoko patogeni virusi aviarnе influence tipa A (HPAI), predstavlja grožnjo zaradi visoke virulentnosti, visoke smrtnosti ter endemične prisotnosti virusa v širokem geografskem področju. Viruse influence uvrščamo v družino *Orthomyxoviridae*. Na osnovi strukturnih razlik nukleoproteina (NP) in matričnega proteina (M) jih delimo v viruse influence tipa A, B in C. Virusi influence A so bili izolirani iz številnih živalskih vrst. Pojavljajo se pri ljudeh, prašičih, konjih, vodnih in drugih sesalcih ter pticah. Virus influence A spada med viruse z ovojnico. Njegov genom je sestavljen iz 8 kosov linearne, enovijačne RNA. Glavni antigenski determinanti sta transmembranska glikozilirana proteina hemaglutinin (HA oz. H) in neuraminidaza (NA oz. N). Viruse influence A delimo na podlagi antigenosti teh dveh površinskih proteinov v različne podtipе – obstaja 16 podtipov hemaglutinina (H1-H16) in 9 podtipov neuraminidaze (N1-N9). HA je udeležen pri vezavi virusa na receptor gostiteljske celice in pri vstopu virusnega genoma v tarčno celico. Deluje kot glavni antigen pri tvorbi nevtralizacijskih protiteles. HA je sestavljen iz dveh disulfidno povezanih podenot – HA1 in HA2. HA1 je globularni del proteina, ki je tudi najbolj variabilen. Podobno je na površini virusa lokalizirana neuraminidaza (NA), ki ima encimatsko funkcijo. Njena glavna naloga je odcepljanje novonastalih virusnih partiklov iz celic. Tako HA kot NA sta podvržena mutacijam predvsem v antigenskih mestih, kar zmanjšuje ali inhibira vezavo nevtralizacijskih protiteles in tako omogoča neovirano razmnoževanje novih virusnih podtipov. Pojav, znan kot antigenski zasuk (drift), je vzrok za epidemije sezonske gripe v zimskem času. V nasprotju pa velike genetske spremembe, znane kot antigenski premik (shift), ki se največkrat zgodijo pri dvojno okuženih osebkih, povzročijo prerazporeditev genoma in vodijo v nove viruse influence A.

Glede na patogenost za perutnino in ptice delimo viruse influence A v (HPAI), ki povzročajo ob okužbi visoko obolevnost in mortalnost - ti pripadajo podtipoma H5 in H7, in druge, ki povzročajo milejšo obliko obolenja (nizko patogeni virusi-LPAI).

Izbruhi HPAI imajo lahko katastrofalne posledice za kmetijstvo in perutninsko industrijo na prizadetih območjih. Ekonomske izgube ne nastajajo le zaradi neposrednih smrti velikega števila živali, ampak tudi zaradi nujnih preventivnih ukrepov, ki preprečijo širjenje bolezni.

Visoko patogeni sev virusa influence A, H5N1, so prvič izolirali iz gojene gosi na Kitajskem leta 1996, do danes pa je povzročil smrt milijonov perutnine po državah Azije, Evrope in Afrike. Od leta 1997 dalje je Svetovna zdravstvena organizacija zabeležila tudi 534 ljudi, okuženih z virusom gripe H5N1, od katerih jih je kar 316 umrlo. Zaenkrat so se vsi ljudje okužili z neposrednim stikom z okuženo perutnino.

Relativno malo je poznanega o dejavnikih, ki so pomembni za preskok okužbe pri različnih vrstah živali, posebej med pticami, in o vzrokih zakaj se okužba z istim virusom lahko izkazuje v različnih oblikah. Filogenetske študije izoliranih virusov so pokazale na obstoj vrstno specifičnih virusnih genov kot tudi na obstoj virusnih genov, ki so prestopili vrstne ovire. V okviru projekta smo se osredotočili na slovenske izolate virusa aviarnе influence H5N1. Raziskali molekularne značilnosti izolatov virusa H5N1, ki smo jih izolirali iz različnih vrst okuženih ptic v času izbruha HPAI v Sloveniji. Na molekularnem nivoju smo raziskali dva izolata, ki smo jih pridobili iz labodov grbcev – prvi in zadnji izolat v času izbruha AI - ter izolate iz sive čaplje, race mlakarice in dolgorepe race. Z uporabo programa MEGA 4.0 smo opravili primerjavo nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij na genih za HA, NA, NP, M in nestrukturni (NS) protein med posameznimi izolati pridobljenimi iz različnih vrst ptic, prav tako pa tudi z nekaterimi zaporedji izolatov virusov H5N1 izoliranimi v Evropi in Aziji. Primerjava zaporedij nukleotidov je pokazala 100 odstotno homologijo naših izolatov na NA genu. Drugi geni pa so se med seboj razlikovali v nekaj polimorfizmih. Na podlagi filogenetske analize gena za NA so bili primerjani izolati uvrščeni v EMA skupino 1 in najbolj sorodni z italijanskimi izolati Cygnus olor/Italy/808/06 and Mallard/Italy/835/2006. Primerjava na genu za HA, NP in NS je pokazala, da se izolat race mlakarice razlikuje od drugih slovenskih izolatov. Filogenetska analiza na osnovi nukleotidnega zaporedja za gen HA je pokazala, da ta izolat spada v drugo skupino in je najbolj podoben izolatu iz Sudana (A/chicken/Sudan/1784-7/2006). Podatki nakazujejo, da smo v Sloveniji v relativno kratkem času izbruh tega virusa pri prostoživečih pticah imeli vnos dveh različnih visoko patogenih virusov H5N1.

Opravili smo testiranja primernosti izolacije virusa H5N1 na različnih celičnih linijah aviarnega in sesalskega izvora. V primerjalni študiji smo uporabili piščančje embrionalne celice (CEC),

zarodne ledvične celice hrčkov (BHK), ledvične celice prašičev (PK) in kunčje ledvične celice (RK) in jih primerjali s standardnim postopkom izolacije na kokošjih embrijih. Primernost različnih celičnih linij za razmnoževanje virusa AI smo predvideli na podlagi izražanja citopatskega efekta in na podlagi količine kopij genoma virusa, ki smo jih zaznali z RT-PCR v realnem času. Ob tem smo analizirali tudi potencialne molekularne spremembe na pomembnejših antigenskih determinantah kot je gen za HA. Rezultati naših raziskav so pokazali, da razmnoževanje AIV (Slo/649/2006) na embrijih vodi do nekaterih mutacij na genu za HA; po prvi pasaži na kokošjih embrijih je prišlo do zamenjave valina z izoleucinom na poziciji 437. Pri zaporednih pasažah na celičnih kulturah teh sprememb nismo zaznali. Podatek je pomemben predvsem iz vidika diagnostike in karakterizacije virusov AI, kjer se zaporedne pasaže pogosto opravljajo na kokošjih embrijih.

Z imunizacijo mišk s slovenskim izolatom virusa H5N1 smo pridobili mišja monoklonska protitelesa (mAb) specifična za različne eptitope virusa H5N1. V pridobljenih supernatantih 7 klonov hibridomov smo preverili aktivnost in specifičnost mAb z encimsko imunsko metodo (iDIBA). Ugotovili smo, da mAb različno reagirajo z virusoma H5N1 in H5N2. Pripravljena mAb smo izolirali ter očistili z gelsko kromatografijo. Frakcije posameznega vzorca z največjo vsebnostjo aktivnih imunoglobulinov G (IgG) smo združili in skoncentrirali. Opazili smo, da se kloni med seboj ločijo tudi po količini sintetiziranih mAb. Z encimsko imunskimi reakcijami posameznih mAb z ločenim virusnimi proteini (metoda prenosa western) smo dokazali, da naša mAb prepoznavajo različne virusne proteine H5N1 in H5N2. Izpostavili smo reakcije 4 mAb. Za mAb 1C2C3 sklepamo, da so specifična za hemaglutinin (HA) podtipa H5. Za mAb 2F4B6 predpostavljamo, da so specifična za nevraminidazo virusa H5N1, podtipa N1. Za mAb 4H2B4 sklepamo, da so specifična za podenoto HA1 virusnega HA. mAb 1C2C3 in 2F4B6 smo določili nukleotidno zaporedje variabilne regije težke verige (VH) IgG in dokazali razlike v komplementarnosti določujočih regijah. Podrobneje smo okarakterizirali tudi mAb 1C2. Ta reagirajo s širokim naborom virusov tipa A. Pri poravnavi aminokislinskih zaporedij različnih podtipov hemaglutininov ali nevraminidaz, ki jih prepoznavajo protitelesa tipa 1C2 nismo uspeli določiti skupnega zaporedja, zato domnevamo, da mAb prepoznavajo nek drug virusni plašni protein.

Tri izbrana monoklonska protitelesa smo uporabili za testiranje v testu nevtralizacije (SNT) na različnih celičnih linijah (CEC, BHK in PK) ter na kokošjih embrijih. Kot antigen smo uporabili izolat visoko patogenega AI virusa H5N1. Rezultati raziskav so pokazali, da monoklonska protitelesa ne preprečujejo razmnoževanja virusa v embriju oz. na celičnih kulturah.

Prav tako smo optimizirali metodo RT-PCR v realnem času za detekcijo AIV v okoljskih vzorcih in stelji z iztrebki, ki so lahko pomemben vir okužbe.

Za bakterijo *Mycoplasma synoviae* (MS) je značilno, da ob sočasnih okužbah z različnimi patogeni, med njimi tudi virusi AI, povzroča veliki hujšo klinično sliko bolezni. V okviru projekta optimizirali izolacijo MS na kokošjih embrijih in opazovali spremembe na embrijih, ki jih je okužba povzročila. Patomorfoloških sprememb ni bilo opaziti. Embrije smo žrtvovali po 8 - 10 dneh po inokulaciji. Embrijem smo odvzeli različne organe, ki so vpleteni v imunski odgovor: timus, vranica, jetra, bursa Fabricii, ter kri in alantoisno tekočino. Iz organom smo izolirali RNA za proučitev izražanja citokinov. Optimizirali smo tudi metodo potrditve MS z PCR v realnem času.

4. Ocena stopnje realizacije zastavljenih raziskovalnih ciljev⁴

Ocenjujemo, da smo cilje projekta izpolnili.

5. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine⁵

Program raziskovalnega projekta ni bil spremenjen v smislu kakovosti izvedbe in potrditev vseh zastavljenih hipotez.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁶

	Znanstveni rezultat		
1.	Naslov	SLO	Genomska analiza povezav med evropskimi in afriškimi virusi influence (H5N1)
		ANG	Genome analysis linking recent European and African influenza (H5N1) viruses.
	Opis	SLO	Za boljše razumevanje ekologije in epidemiologije visoko patogenega virusa aviarnе influence in njegove razširitve so bili analizirani kompletni genomi 36 virusov aviarnе influence A, pridobljenih iz ptic Evrope, severne Afrike in jugovzhodne Azije. Gre za prvo kompletno analizo virusnih genomov influence (H5N1) izven Azije, ki opisuje tipe, virusa v Evropi in Afriki in nakazuje razmerje med temi izolati in drugimi sevi, ki ogrožajo ptice in človeka.
		ANG	To better understand the ecology and epidemiology of the highly pathogenic avian influenza virus in its transcontinental spread, we sequenced and analyzed the complete genomes of 36 recent influenza A (H5N1) viruses collected from birds in Europe, northern Africa, and southeastern Asia. These sequences, among the first complete genomes of influenza (H5N1) viruses outside Asia, clearly depict the lineages now infecting wild and domestic birds in Europe and Africa.
	Objavljeno v		SALZBERG, Steven L., KINGSFORD, Carl, CATTOLI, Giovanni, SPIRO, David J., JANIES, Daniel A., MEHREZ ALY, Mona, BROWN, Ian H., COUACY-HYMANN, Emmanuel, DE MIA, Gian Mario, DUNG, Do Huu, GUERCIO, Annalisa, JOANNIS, Tony, MAKEN ALI, Ali Safer, OSMANI, Azizullah, PADALINO, Iolanda, SAAD, Magdi D., SAVIĆ, V., SENGAMALAY, Naomi A., YINGST, Samuel, ZABORSKY, Jennifer, ZORMAN-ROJS, Olga, GHEDIN, Elodie, CAPUA, Ilaria. Emerg. infect. dis. (Print), 2007, vol. 13, no. 5, str. 713-718.
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		2773370
2.	Naslov	SLO	Dokaz virusov aviarnе influence in paramiksovirusov podtipa 2 pri pticah selivkah v Sloveniji
		ANG	Evidence of avian influenza virus and paramyxovirus subtype 2 in wild-living passerine birds in Slovenia
	Opis	SLO	Opravili smo raziskavo morebitne prekuženosti ptic selivk z virusi aviarnе influence in paramiksovirusi. V raziskavo smo zajeli 37 vrst ptic selivk. Za dokaz obeh virusov smo uporabili molekularne in konvencionalne metode detekcije oz. izolacije virusov. Z molekularnimi metodami smo virus aviarnе influence potrdili pri škorcu (<i>Sternus vulgaris</i>), vendar virusa na kokošnjih embrijih nismo uspeli izolirati.
		ANG	A total of 670 cloacal swabs were taken from 37 species of wild-living passerine birds in years 2004, 2005, and 2006. Isolation of avian influenza virus (AIV) and avian paramyxoviruses (APMV) was done on chicken embryos. One-step reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect AIV RNA. AIV nucleic acid was detected by RT-PCR in a sample of one common starling (<i>Sturnus vulgaris</i>).
	Objavljeno v		RAČNIK, Joško, SLAVEC, Brigita, TRILAR, Tomi, ZADRAVEC, Marko, DOVČ, Alenka, KRAPEŽ, Uroš, BARLIČ-MAGANJA, Darja, ZORMAN-ROJS, Olga. Evidence of avian influenza virus and paramyxovirus subtype 2 in wild-living passerine birds in Slovenia. Eur. J. Wildlife Res., 2008, vol. 54, no. 3, str. 529-532, doi: 10.1007/s10344-007-0164-5.
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		652277
3.	Naslov	SLO	Primerjava različnih celičnih kultur za izolacijo virusa virokopatogenega virusa H5N1
		ANG	Comparison of different cell cultures for the isolation of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus (HPAI)
	Opis	SLO	V raziskavi smo primerjali sposobnost adaptacije in rasti visokopatogenega izolata AI virusa H5N1 na različne celične kulture ptičjega in sesalskega izvora. Hkrati smo ugotavljali tudi potencialne mutacije, ki ob tem lahko nastanejo na pomembnejših antigenskih determinantah virusa. Potrdili smo,

			da izolacija na embrijih privede do mutaciji na genu za HA, medtem, ko pri izolaciji na celičnih kulturah mutacij nismo opazili.
		ANG	In present study we investigated the ability of HPAI isolate H5N1 of avian origin to adopt and grow on different cell cultures of avian and mammalian origin. We analyzed also potential molecular changes on main antigenic determinates such as hemagglutinin gene. The results confirmed that passages on embryonated eggs lead to mutation in hemagglutinin gene, meanwhile no mutations were observed after passages on cell cultures.
	Objavljeno v		V: BALENOVIĆ, Mirta (ur.). VIII. Peradarski dani 2009, Poreč, 25. - 28. 2009. Zbornik. Zagreb: Centar za peradarstvo, 2009, str. 48-55.
	Tipologija		1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci
	COBISS.SI-ID		3048570
4.	Naslov	SLO	Ugotavljanje nevraminidazne aktivnosti pri ptičjih vrstah mikoplazem
		ANG	A survey of avian Mycoplasma species for neuraminidase enzymatic activity
	Opis	SLO	Ugotovljena je bila nevraminidazna aktivnost pri različnih vrstah ptičjih mikoplazem. Način njenega delovanja je podoben tistemu pri virusu aviarne influence. Oba tipa neuraminidaz delujeta tako, da cepita sialične ostanke mukopolisaharidov celic gostitelja. Ker so mikoplazme velikokrat prisotne pri pticah, je poznavanje njihovega delovanja izrednega pomena tudi zaradi študij patobiologije virusa aviarne influence
		ANG	The aim of the study was to determine which avian mycoplasma species possess neuraminidase enzymatic activity (NEAC). Namely, neuraminidases are considered virulence factors in many pathogenic microorganisms, including avian influenza viruses. Our study provides novel informations about NEAC in avian mycoplasma species and suggests that higher invasiveness and possibly, the pathological processes might be associated with their NEAC.
	Objavljeno v		Vet. microbiol., 2008, issue 3/4, vol. 130, str. 391-397, doi: 10.1016/j.vetmic.2008.02.004.
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		2278536
5.	Naslov	SLO	Možne poti širjenja visokopatogenega virusa aviarne influence podtipa H5N1 pri perutnini in pticah v Centralni Evropi v letu 2007
		ANG	Possible sources and spreading routes of H5N1 infections in poultry and wild birds in Central Europe in 2007
	Opis	SLO	Raziskane so bile možnosti vnosa in poti prenosa virusa visokopatogene aviarne influence v Centralni Evropi pri perutnini in pticah v letu 2007.
		ANG	Recurrent outbreaks of H5N1 HPAIV occurred in several Central European countries in 2007. In-depth phylogenetic analyses including full-length sequences of the viruses involved were performed in order to elucidate possible origins of incursions and transmission pathways.
	Objavljeno v		HAASE, Martin, STARICK, Elke, FEREIDOUNI, Sasan, STREBELOW, Günter, GRUND, Christian, SEELAND, Anett, SCHEUNER, Carmen, CIESLIK, Dietmar, SMIETANKA, Krzysztof, MINTA, Zenon, ZORMAN-ROJS, Olga, MOJZIS, Miroslav, GOLETIĆ, T., JESTIN, Veronique, SCHULENBURG, Bodo, PYBUS, Oliver, METTERLEIN, Thomas, BEER, Martin, HARDER, Timm. Infection, genetics and evolution, 2010, vol. 10, no. 7, str. 1075-1084.
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		3245434

7. Najpomembnejši družbeno-ekonomsko relevantni rezultati projektne skupine⁶

	Družbeno-ekonomsko relevantni rezultat		
1.	Naslov	SLO	Epidemiološka študija aviarne influence in bolezni zahodnega Nila (West Nile) pri pticah v Sloveniji : doktorska disertacija.
		ANG	Epidemiological study of avian influenza and west Nile virus in birds in Slovenia
	Opis	SLO	Izmed 1907 pregledanih prostoživečih ptic iz 15 redov je bil nizko patogeni virus AI potrjen pri racah mlakaricah, labodih grbcih, kozici, velikemu kormoranu in presenetljivo tudi pri škorcu.

			Okužba z visokopatogenim sevom H5N1 je bila potrjena pri labodih grbcih, pozitivne pa so bile tudi race mlakarice, sivi čapelji in dolgorepa raca.
		ANG	Among 1907 examined wild birds 16 of them were positive for low pathogenic avian influenza viruses. In most cases the aquatic wild birds were the positive ones: mallards, mute swans, a common snipe, a great cormorant and a starling. Infections with HPAI were confirmed in mute swans, grey herons, a mallard and the first time in Europe also in a pintail
	Šifra		D.09 Mentorstvo doktorandom
	Objavljeno v		RAČNIK, Joško. Epidemiološka študija aviarnne influence in bolezni zahodnega Nila (West Nile) pri pticah v Sloveniji : doktorska disertacija. Ljubljana: [J. Račnik], 2008. 162 f., ilustr., zemlj. [COBISS.SI-ID 2899322] , mentor Olga Zorman Rojs RAČNIK, Joško. Epidemiološka študija aviarnne influence in bolezni zahodnega Nila (West Nile) pri pticah v Sloveniji
	Tipologija		2.08 Doktorska disertacija
	COBISS.SI-ID		2899322
2.	Naslov	SLO	ČELESNIK, Nina. Priprava in delni opis monoklonskih protiteles proti virusu ptičje gripe H5N1 : diplomsko delo, univerzitetni študij =
		ANG	Preparation and partial description of monoclonal antibodies against H5N1 avian influenza virus
	Opis	SLO	Namen diplomske naloge je bil pridobiti monoklonalna protitelesa, specifična za različne epitope slovenskega izolata virusa H5N1 in jih opisati.
		ANG	The purpose was to produce and characterise monoclonal antibodies specific for various epitopes of HPAI H5N1 isolate from Slovenia.
	Šifra		D.10 Pedagoško delo
	Objavljeno v		Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, Ljubljana, Diplomске naloge, 371). Ljubljana: [N. Čelesnik], 2008. IX, 67 f., graf. prikazi, tabele
	Tipologija		2.11 Diplomsko delo
	COBISS.SI-ID		3547256
3.	Naslov	SLO	Vodenje nacionalnega laboratorija za aviarno influenco . dr. Brigita Slavec
		ANG	Preciding over a National Reference laboratory for Avian Influenza
	Opis	SLO	Dr. Brigita Slavec je vodja Nacionalnega referenčnega laboratorija za aviarno influenco v R Sloveniji
		ANG	Dr. Brigita Slavec is a chief of National Reference Laboratory for Avian Influenza in Slovenia
	Šifra		D.07 Vodenje centra/laboratorija
	Objavljeno v		V Simulacijska vaja in delavnica: Aviarna influenza, Dolenjske Toplice, 19 - 20 maj 2009. Simulacijska vaja in delavnica, Ljubljana: Veterinarska uprava RS, 2009, str. 10 - 24
	Tipologija		1.07 Objavljeni strokovni prispevek na konferenci (vabljen predavanje)
	COBISS.SI-ID		3066234
4.	Naslov	SLO	BERNIK, Janez. Karakterizacija monoklonskih protiteles proti virusu ptičje gripe H5N1 : diplomsko delo
		ANG	Characterization of monoclonal antibodies against avian flu virus H5N1 : graduation thesis,
	Opis	SLO	Namen dela je bil izbrati najustreznejša protitelesa in jih natančneje okarakterizirati ter izdelati 3D model vezavnega mesta za antigen v variabilni regiji protitelesa. Z indirektnim testom DIBA smo protitelesa testirali proti 16 različnim podtipom antigenov aviarnne influence. Z SDS-PAGE elektroforezo in prenosom western smo preverili prisotnost težkih in lahkih verig pri pripravljenih protitelesih.
		ANG	Purpose of this research was to select and accurately characterize the most appropriate antibodies. 3D modulation of antigen binding site in the variable regions of antibodies was also our target. 16 different influenza A viruses were tested against the prepared antibodies with iDIBA test. The presence of heavy and light chains of antibodies was verified by SDS-PAGE electrophoresis and western blot transfer. W
	Šifra		D.10 Pedagoško delo
			BERNIK, Janez. Karakterizacija monoklonskih protiteles proti virusu ptičje

	Objavljeno v		gripe H5N1 : diplomsko delo (Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Diplomsko dela, 50). Ljubljana: [J. Bernik], 2010. X, 51 f., ilustr., preglednice. [COBISS.SI-ID]
	Tipologija		2.11 Diplomsko delo
	COBISS.SI-ID		6524793
5.	Naslov	SLO	Evaluacija metod za izolacijo RNA iz različnih okoljskih vzorcev z RT-PCR v realnem času
		ANG	Evaluation of RNA isolation methods for the detection of influenza A viruses in different environmental samples by real time RT-PCR
	Opis	SLO	Relat je podatkov o rezistentnosti virusov AI v okolju. Namen našega dela je bil razviti učinkovito molekularno metodo za detekcijo AIV, ki bi omogočala ugotavljanje virusa v kompleksnih okoljskih vzorcih. V ta namen smo izbrali manj in bolj kompleksne okoljske materiale. Testirali smo različne metode za izolacijo RNA in njeno uspešnost ugotavljali z uporabo implementirane metode RT-PCR v realnem času.
		ANG	So far, only a few data about the resistance of the AIV in the environment exist. The purpose of our work was to develop an efficient molecular method for AIV detection which enables us to trace the virus in complex environmental samples. Different RNA isolation methods were tested.
	Šifra		F.01 Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin
	Objavljeno v		V: BALENOVIČ, Mirta (ur.). VIII. Peradarski dani 2009, Poreč, 25. - 28. 2009. Zbornik. Zagreb: Centar za peradarstvo, 2009, str. 124-128.
	Tipologija		1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci
	COBISS.SI-ID		3049594

8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁸

Velik interes po naših spoznanjih se je izkazal v toku simpozij a Teaching Climate Changes and United Nation System, ki je potekal v Beogradu (17 - 18. 5.2010) v okviru 2nd CEE/SEE Regional Colloquium , Capacity Building on Global Governance and the UN System, kjer je bilo predstavljeno predavanje:

Olga Zorman Rojs et al: Climate changes and emergence of some zoonotic diseases, Teaching Climate Changes and United Nation System, Beograd, 17 - 18 5.2010, 2nd CEE/SEE Regional Colloquium , Capacity Building on Global Governance and the UN System.

Vodja projekta Olga Zorman Rojs je slovenski koordinator projekta Flu-Lab_net, ki se izvaja v okviru 7 okvirnega programa.

9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁹

9.1. Pomen za razvoj znanosti¹⁰

SLO

Aviarna influenza je ena od dveh najpomembnejših bolezni perutnine in ptic. Množica izbruhov te bolezni pri različnih vrstah divjih ptic, pri domači perutnini in okužbe sesalcev, vključujoč tudi ljudi, vzbujajo v zadnjem času izjemno skrb v veterinarski in humani medicini. Hitro širjenje bolezni in njena neobvladljivost pa nakazujejo, da so znanja o samem povzročitelju in bolezni še vedno pomanjkljiva.

Relativno malo je poznanega o dejavnikih, ki so pomembni za preskok okužbe pri različnih vrstah živali, posebej med pticami, in o vzrokih zakaj se okužba z istim virusom lahko izkazuje v različnih oblikah.

Opravili smo molekularno karakterizacijo pomembnejših virusnih proteinov slovenskih izolatov virusa H5N1 in na podlagi filogenetske analize gena za HA ugotovili, da so bili primerjani izolati uvrščeni v EMA skupino 1 in sorodni z drugimi virusi izoliranimi v drugih evropskih državah. Filogenetska analiza na osnovi nukleotidnega zaporedja za gen HA je pokazala, da ta izolat race spada v drugo skupino in je najbolj podoben izolatu iz Sudana (A/chicken/Sudan/1784-7/2006). Podatki nakazujejo, da smo v Sloveniji imeli vnos dveh različnih visoko patogenih virusov H5N1.

Preučili smo možnosti namnoževanja virusa v različnih tipih celičnih kultur ali tkiv, ki izvirajo iz ptic ali sesalcev. Hkrati smo ugotavljali tudi potencialne mutacije, ki ob tem lahko nastanejo na pomembnejših antigenskih determinantah virusa. Razmnoževanje virusa smo ugotavljali z uporabo RT - PCR v realnem času in na podlagi citopatskega efekta. Rezultati so pokazali, da

razmnoževanje virusa na kokošjih embrijih privede do mutacij na genu za HA, na celičnih kulturah teh sprememb nismo ugotovili. Izpopolnjene serološke metode so podlaga za nadaljnje študije imunskega odgovora pri različnih vrstah ptic. Pridobili smo monoklonalna protitelesa, specifična za različne epitope slovenskega izolata virusa H5N1 in jih opisali. S študijo mehanizmov interakcij med AIV in mikoplazmami smo osvetlili tudi patogenezo sočasnih okužb, ki so v naravi zelo pogoste.

ANG

Highly pathogenic avian influenza (AI) was one of the first viral diseases described in poultry. Ongoing outbreaks of H5N1 AI in migratory waterfowl, domestic poultry and also in mammals present a continuing treat in the fields of animal and human health. The increasing relevance of AI has highlighted the lack of scientific information on several aspects of the disease. Very little is known about the viral and host factors that determine the species range of influenza viruses. The molecular characterization of the important viral proteins of the recent Slovene isolates was studied. Viruses identified in Slovenia showed close relationship with H5N1 viruses from other European countries (EMA clade 1) Comparison of nucleotide sequences of hemagglutinin gene obtained for H5N1 isolates from different bird species indicated that two different HPAI H5N1 viruses were introduced in Slovenia in 2006, despite relatively short duration of HPAI outbreak.

We compared the ability of HPAI isolate H5N1 of avian origin to adopt and grow on different cells cultures of avian and mammalian origin. We analyzed also potential molecular changes on main antigenic determinates such as hemagglutinin gene. The growth of the virus was estimated by determination of genome copies by real time RT-PCR and determination of cythopatic effect (CPE). The results confirmed that passages on embryonated eggs lead to mutation in hemagglutinin gene, meanwhile no mutations were observed after passages on cell cultures.

The new serological methods will allow further studies on immunologic response of different species of birds against different pathogens, including AIV of particular subtype e.g.H5N1. We were able to produce and characterise monoclonal antibodies specific for various epitopes of HPAI H5N1 isolate from Slovenia.

It also could be expected that data from the study of the interaction between Mycoplasma species provide an insights into mechanisms leading to the increased pathogenicity in such concomitant infections.

9.2. Pomen za razvoj Slovenije¹¹

SLO

Raziskovalni projekt se nanaša na perečo problematiko aviarne influence, ki se je v izjemnem obsegu izkazal v Sloveniji in drugih državah sveta v letu 2006. Strah, da bi se visoko patogeni virus H5N1 razširil pri domači perutnini ali celo med humano populacijo, zahteva nadaljnje poglobljene raziskave molekularnih značilnosti izolatov virusa AI in njihove zmožnosti namnoževanja v različnih celičnih kulturah in tkivih. Razvili in izpopolnili smo diagnostične postopke za dokazovanje te bolezni, kar je izjemnega pomena za prihodnost, saj lahko upravičeno pričakujemo poslabšanje epizootiološke situacije pri živalih ali celo nastanek nove pandemije.

Prostoživeče ptice so pomembni del naravne živalske populacije v Sloveniji, okužbe in hitro širjenje aviarne influence med njimi pa predstavlja zanje resno grožnjo. Raziskovalni projekt je prispeval k poznavanju mehanizmov okužbe pri njih kot tudi k razvoju diagnostičnih metod za nadzor te bolezni v Sloveniji.

ANG

This study is relevant to the situation that occurred in Slovenia (and also elsewhere) in the spring 2006. A fear of transmission of AIV H5N1 to the domestic poultry and particularly to human population was obvious. This clearly requires further investigations concerning the AIV that have been isolated from wild birds in Slovenia, as well as further studies concerning the ability of H5N1 to infect and replicate in different types of cells. We are convinced that results of this research project would be very valuable, particularly in the case that new treat of AIV and potential pandemic situation will occur again.

The infection with AIV represent a considerable danger also to a number of free-living birds which represent a valuable part of the natural population in Slovenia. Results of our research project provide several data that enable better understanding of their infection with AIV. We improved diagnostics tests for more rapid and accurate detection of the AIV infection.

--

10. Samo za aplikativne projekte!

Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri aplikativnem projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni

Cilj		
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE

	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	

	Uporaba rezultatov	
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanju naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.28	Priprava/organizacija razstave	

	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	

Komentar

--

11. Samo za aplikativne projekte!

Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	

G.01	Razvoj visoko-šolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☐	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☐	
G.01.03.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	☐	☐	☐	☐	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	☐	☐	☐	☐	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	☐	☐	☐	☐	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	☐	☐	☐	☐	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	☐	☐	☐	☐	
G.02.07.	Večji delež izvoza	☐	☐	☐	☐	
G.02.08.	Povečanje dobička	☐	☐	☐	☐	
G.02.09.	Nova delovna mesta	☐	☐	☐	☐	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	☐	☐	☐	☐	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	☐	☐	☐	☐	
G.02.12.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	☐	☐	☐	☐	
G.03.04.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	☐	☐	☐	☐	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	☐	☐	☐	☐	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	☐	☐	☐	☐	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	☐	☐	☐	☐	
G.04.06.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete	☐	☐	☐	☐	
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj	☐	☐	☐	☐	
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.02.	Prometna infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.03.	Energetska infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.04.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	

G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva	☐	☐	☐	☐	
G.09.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	

Komentar

--

12. Pomen raziskovanja za sofinancerje, navedene v 2. točki [12](#)

1.	Sofinancer			
	Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:			EUR
	Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:			%
	Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja			Šifra
		1.		
		2.		
		3.		
		4.		
		5.		
	Komentar			
Ocena				
2.	Sofinancer			
	Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:			EUR
	Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:			%
	Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja			Šifra
		1.		
		2.		
		3.		
		4.		
		5.		
	Komentar			
Ocena				
3.	Sofinancer			
	Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:			EUR

Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:			%
Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja			Šifra
	1.		
	2.		
	3.		
	4.		
	5.		
Komentar			
Ocena			

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja, za objavo 6., 7. in 8. točke na spletni strani <http://sicris.izum.si/> ter obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta

Podpisi:

Olga Zorman Rojs	in	
podpis vodje raziskovalnega projekta		zastopnik oz. pooblaščen oseba RO

Kraj in datum:

Ljubljana

4.5.2011

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2011-1/244

¹ Zaradi spremembe klasifikacije družbeno ekonomskih ciljev je potrebno v poročilu opredeliti družbeno ekonomski cilj po novi klasifikaciji. [Nazaj](#)

² Samo za aplikativne projekte. [Nazaj](#)

³ Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja ter rezultate in učinke raziskovalnega projekta. Največ 18.000 znakov vključno s presledki (približno tri strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁴ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁵ V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta (obrazložitev). V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁶ Navedite največ pet najpomembnejših znanstvenih rezultatov projektne skupine, ki so nastali v času trajanja projekta v okviru raziskovalnega projekta, ki je predmet poročanja. Za vsak rezultat navedite naslov v slovenskem in angleškem jeziku (največ 150 znakov vključno s presledki), rezultat opišite (največ 600 znakov vključno s presledki) v slovenskem in angleškem jeziku, navedite, kje je objavljen (največ 500 znakov vključno s presledki), izberite ustrezno

šifro tipa objave po Tipologiji dokumentov/del za vodenje bibliografij v sistemu COBISS ter napišite ustrezno COBISS.SI-ID številko bibliografske enote.
Navedeni rezultati bodo objavljeni na spletni strani <http://sicris.izum.si/>.

PRIMER (v slovenskem jeziku):

Naslov: Regulacija delovanja beta-2 integrinskih receptorjev s katepsinom X;

Opis: Cisteinske proteaze imajo pomembno vlogo pri nastanku in napredovanju raka. Zadnje študije kažejo njihovo povezanost s procesi celičnega signaliziranja in imunskega odziva. V tem znanstvenem članku smo prvi dokazali... (največ 600 znakov vključno s presledki)

Objavljeno v: OBERMAJER, N., PREMZL, A., ZAVAŠNIK-BERGANT, T., TURK, B., KOS, J.. Carboxypeptidase cathepsin X mediates $\beta 2$ - integrin dependent adhesion of differentiated U-937 cells. Exp. Cell Res., 2006, 312, 2515-2527, JCR IF (2005): 4.148

Tipologija: 1.01 - Izvirni znanstveni članek

COBISS.SI-ID: 1920113 [Nazaj](#)

⁷ Navedite največ pet najpomembnejših družbeno-ekonomsko relevantnih rezultatov projektne skupine, ki so nastali v času trajanja projekta v okviru raziskovalnega projekta, ki je predmet poročanja. Za vsak rezultat navedite naslov (največ 150 znakov vključno s presledki), rezultat opišite (največ 600 znakov vključno s presledki), izberite ustrezen rezultat, ki je v Šifrantu raziskovalnih rezultatov in učinkov (Glej: <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/sif-razisk-rezult.asp>), navedite, kje je rezultat objavljen (največ 500 znakov vključno s presledki), izberite ustrezno šifro tipa objave po Tipologiji dokumentov/del za vodenje bibliografij v sistemu COBISS ter napišite ustrezno COBISS.SI-ID številko bibliografske enote.

Navedeni rezultati bodo objavljeni na spletni strani <http://sicris.izum.si/>. [Nazaj](#)

⁸ Navedite rezultate raziskovalnega projekta v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 6 in 7 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov vključno s presledki. [Nazaj](#)

⁹ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)

¹⁰ Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

¹¹ Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

¹² Rubrike izpolnite/prepišite skladno z obrazcem "Izjava sofinancerja" (<http://www.arrs.gov.si/sl/progproj/rproj/gradivo/>), ki ga mora izpolniti sofinancer. Podpisan obrazec "Izjava sofinancerja" pridobi in hrani nosilna raziskovalna organizacija – izvajalka projekta. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2011-1 v1.01

02-79-1D-44-63-FD-B9-96-A7-7B-EA-1D-3F-13-DC-0D-A7-5C-50-65