

I. B. Vsebina/opis predlaganega raziskovalnega programa

Šifra (ARRS) in naslov raziskovalnega programa

Šifra	Naslov raziskovalnega programa
P3-0083	ODNOSI PARAZITSKEGA OBSTAJANJA

Šifra (ARRS) ter ime in priimek vodje raziskovalnega programa

Šifra	Ime in priimek vodje raziskovalnega programa
10331	Tatjana Avšič-Županc

5. Teoretična izhodišča, raziskovalne vsebine in cilji:

Programska skupina ODNOSI PARAZITSKEGA OBSTAJANJA obsega veliko število raziskovalcev, ki raziskujejo številna področja mikrobiologije in imunologije. Različne raziskovalne sklope povezuje tema o proučevanju odnosov med povzročitelji bolezni in gostiteljem, načini prenosa, naravnimi življenjskimi krogi mikroorganizmov in dejavniki, ki vplivajo na nastanek in potek bolezni ter zdravljenje.

BAKTERIOLOŠKI SKLOP:

V okviru projekta EARSS bomo spremljali odpornost bakterij *Staphylococcus aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli* in drugih. Ugotavljali bomo povezavo med porabo antibiotikov in razvojem odpornosti pri povzročiteljih bolnišničnih okužb. Z retrospektivnim in prospektivnim spremljanjem bakterijske odpornosti bomo preverjali učinkovitost različnih ukrepov za preprečevanje širjenja odpornosti. Ker se odpornost bakterij veča, bomo v sodelovanju z drugimi raziskovalci s Fakultete za farmacijo poskušali najti potencialne nove protimikrobne spojine. Preučevali bomo patogenezo sepse in endokarditisa. Ker nekaterih kliničnih bakterijskih izolatov pri bolnikih s sepsom in z endokarditisom s klasičnimi metodami ne moremo identificirati, jih bomo poskušali identificirati s sekveniranjem 16S rRNA z metodo pirosekveniranja in z uporabo genskih knjižnic. Ugotavljali bomo incidenco okužb krvi s kvasovkami, dejavnike tveganja, spekter povzročiteljev in njihovo občutljivost za antimikotike, način zdravljenja ter izid bolezni. Pri bolnikih s sepsom in z endokarditisom bomo poskušali direktno iz krvi ugotavljati prisotnost bakterijske DNA, pri imunsko oslabeledih pa DNA gliv kvasovk. Ugotavljali bomo, kateri od virulentnih dejavnikov *E. coli* je pri bolnikih z okužbo sečil ključen za nastanek urosepse tako, da bomo primerjali prisotnost genov za virulentne dejavnike: fimbrije, piluse in druge adhezine, toksine, siderofore, kapsulo, biofilm, idr. pri izolatih bolnikov z urosepsom z osnovnimi boleznimi in bolnikov brez njih. Iz površinskih vzorcev kože in nohtov bomo proučevali prisotnost črnih kvasovk in njihovo vlogo kot dermatofitov. Analizirali bomo izbruhe bolnišničnih okužb z odpornimi bakterijami, npr. s proti meticilinu odpornimi *Staphylococcus aureus* (MRSA), proti vankomicinu odpornimi enterokoki (VRE), *Klebsiella* spp. ESBL, *Stenotrophomonas maltophilia*, itd., osamljenimi pri hospitaliziranih bolnikih, in skušali pojasniti nastanek oz. poti širjenja v bolnišnici. V določenem časovnem obdobju bomo ugotavljali število in frekvenco posameznih klonov med izolati *S. aureus* iz hemokultur v Sloveniji. Preučevali bomo epidemiologijo CA-MRSA; za te namene bomo uporabljali molekularno biološke tipizacijske metode. S sekvenčno analizo želimo sekvenirati vse naše izolate *Chlamydia trachomatis* in s tem ustvariti zbirko genotipov, ki krožijo v slovenskem prostoru. V

sodelovanju z Veterinarsko kliniko želimo ugotoviti razširjenost *C. psittaci* v Sloveniji. Natančneje želimo opredeliti izolate *Aspergillus fumigatus* iz zunanjega in notranjega zraka ter jih primerjati z izolati bolnikov.

IMUNOLOŠKI SKLOP:

Pri obrambi imunski sistem sprejme različne signale in se odzove na način, primeren nevarnosti, ki ogroža organizem. V različnih okoliščinah se razvijejo ustrezni efektorski mehanizmi, ki odstranijo nevarne dejavnike iz organizma. Patogeni mikroorganizmi in njihove sestavine pa tudi biološko aktivne snovi iz drugih organizmov na različne načine uravnavajo obrambne odzive gostitelja.

Kolonizacija želodca s *H. pylori* povzroča nastanek atrofičnega gastritisa, duodenalne razjede, želodčnega raka in MALT limfoma. Patogeneza okužbe je odvisna od bakterijskih virulenčnih dejavnikov in od imunskega odzivanja gostitelja. V prejšnjih študijah smo pokazali, da okužba s *H. pylori* povzroči močan specifični imunski odziv, ki obsega aktivacijo limfocitov B in T, tvorbo citokinov in kemokinov. Pokazali smo, da je uspeh zdravljenja okužbe odvisen tako od izbire antibiotika, kot od imunskega odziva, zlasti od tvorjenja citokinov IFN- γ in IL-4 s strani celic T. Pokazali smo, da sevi *H. pylori* posameznikov, ki se niso uspešno ozdravili od okužbe, inducirajo nastanek membranske oblike katepsina X v *in vitro* stimuliranih celicah THP-1. Isti sevi so povzročili nastanek obsežne aktivacije limfocitov T in zmanjšane količine izločenega IFN- γ , ki je bistven za eradikacijo bakterije iz sluznice. Katepsin X aktivira Mac-1 integrinske receptorje na makrofagnih celicah THP-1 in inhibira proliferacijo mononuklearnih celic. Ker naši rezultati kažejo na pomembno vlogo naravne imunosti pri eradikaciji *H. pylori*, bomo analizirali sev-specifične razlike LPS-a iz *H. pylori* (hpLPS) in vpliv na indukcijo katepsina X pri celicah THP-1. Analizirali bomo vlogo interakcije hpLPS – CD14 pri indukciji katepsina X z uporabo inhibitorjev interakcije hpLPS – CD14. Analizirali bomo sev-specifične hpLPS s pomočjo molekularnih metod. Z molekularnimi metodami bomo analizirali tudi razlike v produkciji citokinov okuženih ljudi in ugotavljali vpliv posameznih vrst sevov bakterije na potek okužbe, možnost eradikacije bakterije in možnost povzročitve želodčnega raka.

V modelni raziskavi smo potrdili hipotezo, da je za nastanek nevrosifilisa odgovoren nastanek humoralnega imunskega odziva v možganski tekočini preiskovancev s pozno obliko sifilisa. Posredno smo ugotovili, da protitelesa, ki pridejo v likvor zaradi porušena hematoencefalne bariere ali pa se tvorijo tekalno, povzročajo škodo, ki je lahko posledica aktivacije komplementa na možganskih ovojnicah ali morda tudi možganovini. Zanima nas, od kod komplement v likvorju? Predpostavljamo, da se posamezne komponente pojavijo zaradi difuzije skozi hematoencefalno bariero, ni pa izključeno, da se tvorijo tudi lokalno v okoljskih celicah.

Sarkoidoza je kronična vnetna bolezen, označena z granulomskim vnetjem v različnih organih. Razvoj sarkoidoze je verjetno končni rezultat imunskega odziva na različne ubikvitarne sprožitelje iz okolja. Predpostavljamo, da bolnikom s sarkoidozo prisotnost gliv in njihovih sestavin poslabša osnovno bolezen. Bolniki, ki (močneje) reagirajo na sestavine gliv z efektorskimi mehanizmi, kot je tvorba specifičnih protiteles proti glivičnim antigenom ali pa močan vnetni in/ali izraziti T-celični odziv na polisaharide iz gliv, imajo težjo obliko sarkoidoze, ki je bolj odporna na zdravljenje s kortikosteroidi. Domnevamo, da je v poslabšanju sarkoidoze vpleten T-celični odziv Th17, ki vzdržuje kronično vnetno stanje predvsem s spodbujanjem izločanja citokinov, kemokinov in prostaglandinov. Te odzive bi lahko sprožal in/ali spremenil polisaharid 1,3- β -glukan, ki je sestavina celične stene večine gliv in ima nekatere že dokazane imunomodulatorne učinke. Kaže, da se po terapiji z antimikotiki bolezen lahko izboljša, zato domnevamo, da bi odstranitev kronične obremenitve z β -glukanom kot tudi ureditev bivalnega okolja lahko vplivala na izboljšanje bolezni. Po postavitvi modela na mononuklearnih celicah iz levkocitnih koncentratov bomo izolirali mononuklearne celice bolnikov s slabšim in blažjim potekom sarkoidoze. Celice bomo *in vitro* spodbujali z β -glukanom, LPS in poliklonskima aktivatorjema PMA in ionomicinom. Ocenjevali bomo vnetni odziv in T-celične efektorske odzive z merjenjem citokinov, ki so značilni za posamezne odzive.

Polisaharidi iz gliv so po nekaterih podatkih iz literature aktivatorji mehanizmov naravne odpornosti, morda pa tudi regulirajo antigensko specifične imunske odzive. Njihova biološka aktivnost je odvisna od topnosti v vodi, molekulske mase, stopnje razvejanosti in konformacije. S citokinskimi odzivi humanih mononuklearnih celic na polisaharide, izolirane iz nekaterih jedilnih gob, ki so gojene v različnih pogojih, bomo ugotavljali, kako se humane imunske celice *in vitro* odzovejo na te snovi. Predpostavljamo, da bi polisaharidi lahko izzvali sintezo nekaterih vnetnih citokinov, vendar bi bilo potrebno proučiti razmerje med količino TNF α in drugimi vnetnimi citokini, predvsem IL-12 in IFN- γ , pa tudi razmerje s protivnetnimi citokini kot je IL-10.

VIROLOŠKI SKLOP:

Okužbe dihal so med najpogostejšimi vzroki za obolevnost prebivalstva. Z današnjimi metodami diagnostike uspemo etiološko pojasniti do 39 % vseh virusnih okužb dihal. Od leta 2001 so bili v kužninah dihal na novo odkriti številni prej nepoznani virusi: Humani metapneumovirus, virus SARS, koronavirus NL63, koronavirus HKU1, humani bokavirus, nov tip rinovirusa, poliomavirusa WI in KU. Za novoodkrite viruse ni natančno znano kakšne oblike bolezni so lahko posledica okužbe in v kakšnem obsegu so razširjeni v populaciji. Prav tako ni znano, kakšen je njihov vpliv na zbolevanje prebivalstva. Z načrtno študijo in uporabo najsodobnejših molekularnih metod želimo prvič pridobiti vpogled v molekularno epidemiološko situacijo na tem področju. Podatki o etiologiji bi morali odločilno vplivati na diagnostično in terapevtsko strategijo pri obravnavi teh okužb.

Humani enterični virusi so povzročitelji sporadičnih oblik gastroenteritisa, pogosto pa povzročajo tudi izbruhe gastroenteritisov. Iztrebki obolelih ljudi in živali so pogosto kontaminanti različnih vodnih virov, kar predstavlja tveganje za prenos teh virusov v prehransko verigo ali okužbo v rekreativnih vodah. Na ta način je mogoč tudi medvrstni prenos virusov, iz živali na ljudi in obratno in hkratna okužba različnih sevov istega virusa. Hkratne okužbe so osnova za nastanek rekombinantnih virusov ali virusov s prerazporejenim genomom. Cilj naše raziskave je ugotoviti pomen različnih vodnih virov pri kroženju nekaterih enteričnih virusov v okolju. Preučevali bomo genetske spremembe enteričnih virusov (prerazporejanja, rekombinacije) in vpliv teh sprememb na patogenezo in molekularno epidemiologijo.

Humani virusi papiloma (HPV) so izjemno raznoliki DNA-virusi, povezani z različnimi benignimi in malignimi spremembami kože in sluznic. Doslej je bilo z določitvijo celotnega nukleotidnega zaporedja genoma dokončno opredeljenih približno 100 genotipov HPV. Z določanjem nukleotidnega zaporedja celotnega gena L1 pri vsaj 9 različnih, predhodno delno opredeljenih slovenskih izolatih HPV, ki mu bo sledilo določanje nukleotidnega zaporedja celotnega genoma genetsko najbolj raznolikih izolatov, bomo poskušali ugotoviti obstoj vsaj enega novega genotipa HPV.

Virus hepatitisa C, virus hepatitisa B in HIV so najbolj pogosti parenteralno prenosljivi virusi v svetu in v Sloveniji. Molekularna epidemiologija teh virusov, predvsem razporeditev njihovih genotipov in drugih genetskih različic, je v Sloveniji še precejšnja neznanka. Posebej je zaskrbljujoče naraščanje odpornosti proti antiviralnim zdravilom, kar dodatno otežuje obvladovanje hepatitisa B in HIV. Z molekularno-epidemiološko analizo velikega števila izolatov virusa hepatitisa C in virusa hepatitisa B (vključeni bodo izolati iz 15-letnega oziroma 10-letnega obdobja) bomo opredelili genotipe in klinično najpomembnejše genetske različice teh virusov v Sloveniji ter razjasnili nekatere primere manjših epidemij parenteralno prenosljivih virusnih okužb. Nadaljevali bomo z ugotavljanjem razširjenosti odpornosti na protiretrovirusna zdravila in poglobljeno analizo njene molekularne osnove.

V patogenezi virusnih hemoragičnih mrzlic sodelujejo virusni virulenčni dejavniki in imunski (citokinski) mehanizmi gostitelja. Proučevati nameravamo hemoragično mrzlico z renalnim sindromom (HMRS) in krimsko-kongoško hemoragično mrzlico (KKHM). Študirali bomo povezavo med koncentracijo nekaterih vnetnih (IL-12, INF- γ , TNF- α) in regulatornih citokinov (IL-10), s specifičnim protitelesnim odzivom bolnikov, ter virusnim bremenom (koncentracija virusa) glede na potek in izhod bolezni. Potrditi želimo predpostavko, da v patogenezi virusnih hemoragičnih mrzlic (HMRS in KKHM) sodelujejo poleg virulenčnih

dejavnikov virusov tudi imunski mehanizmi gostitelja, ki tako pomembno vplivajo na potek in izid okužbe. Domnevamo, da imajo imunski mehanizmi gostitelja pomembno vlogo v patogenezi hemoragičnih mrzlic. Menimo, da bomo z raziskavo pokazali, da je težji ali celo smrtni potek okužbe z virusom hemoragične mrzlice povezan tudi z nenadzorovanim citokinskim odzivom.

SKLOP ZOONOZE:

V preteklem raziskovalnem programu Odnosi parazitskega obstajanja smo preučevali ekologijo in epidemiologijo mikroorganizmov (bakterij, virusov in parazitov), ki se neposredno (s premalo termično obdelanim okuženim živalskim mesom, kontaminirano hrano in/ali pitno vodo) ali posredno preko prenašalcev prenesejo iz živali na človeka in povzročijo t.i. zoonoze. Kot rezultat programa smo ugotovili, da je za vse zoonotske agense v Sloveniji značilna izredna genetska variabilnost, ki je odvisna od enzootskega oz. zoonotskega življenjskega kroga teh mikroorganizmov. Za infekcijske bolezni vključujoč zoonoze je značilno, da na njihovo širjenje vplivajo različni dejavniki, npr.: pogostnost okuženih živali (domačih in divjih), razširjenost in okuženost ključnih prenašalcev v določeni regiji (npr. klopi), prehrabne navade ljudi, higienski standardi, podnebne spremembe, globalizacija in potovanja predvsem v manj razvite dežele. Če ob teh dejavnikih upoštevamo še opisano genetsko raznolikost zoonotskih agensov, potem ni presenetljivo, da se zoonoze vedno znova pojavljajo na novih območjih kot porajajoče se bolezni ali pa se na starih območjih pojavijo v obliki povečanega števila primerov. Lep primer je npr. vneseni virus Chikungunya v Slovenijo in v sosednjo Italijo, kjer so zabeležili tudi avtohtoni izbruh te bolezni ali pa npr. izbruh vročice Q v Sloveniji leta 2007. Zoonotski agensi so torej prisotni v naravnem okolju, ali pa so v ta okolja prineseni od drugod. Obstaja pa tudi dodatna možnost, da so namerno spuščeni v okolje v bioterorističnem dogodku. Zato je zelo pomembno, da v času velikih okoljskih in podnebnih sprememb nadaljujemo s preučevanjem zoonotski agensov (bakterij, virusov in parazitov), njihove ekologije in epidemiologije. Naš cilj bo zbiranje naravnih vzorcev gostiteljev in prenašalcev, nadaljnje testiranje bolnikov na zoonoze, razvijanje novih, hitrejših ter še bolj specifičnih in občutljivejših metod. S sistematičnim mesečnim nabiranjem klopi in miši na določenih območjih Slovenije in z zbiranjem socialno-ekonomskih podatkov menimo, da bomo pripomogli k izdelavi napovednih modelov za širjenje incidence in prevalence zoonoz (KME) v Sloveniji in drugod po Evropi. Cilj predlaganega programa je tudi priprava nacionalne zbirke izolatov posameznih zoonotskih agensov in njihovih genetskih različic v Sloveniji, ki smo jih in jih še bomo izolirali iz različnih vzorcev. Takšno zbirko bomo lahko uporabili pri razvijanju diagnostičnih metod, za študij imunopatogenetskih mehanizmov, pri razvijanju cepiv ali za boj proti morebitnemu bioterorističnemu dejanju.

6. Predvidene osnovne raziskovalne metode:

BAKTERIOLOŠKI SKLOP:

Za ugotavljanje odpornosti in mehanizmov odpornosti bomo uporabljali klasične in molekularne metode. Za dokazovanje protibakterijske učinkovitosti novih spojin bomo testirali standardne kontrolne seve in klinične izolate z makrodilucijsko metodo.

Uvedli bomo identifikacijo bakterij s sekveniranjem 16S rRNA z metodo pirosekveniranja in z uporabo genskih knjižnic. Za dokazovanje sepse bomo s pomočjo real-time PCR iz krvi ugotavljali prisotnost bakterijske DNA in DNA gliv.

Za dokazovanje genov za virulentne dejavnike in za genotipizacijo bomo uporabljali metode PCR in multipleks PCR ter hibridizacije in sekveniranja.

Za tipizacijo bakterij bomo pri *S. aureus* uporabljali novo metodo tipizacijo *spa*, občasno pa še PFGE in verjetno MLST, za VRE MLST in MLVA, za ostale bakterije pa PFGE, za glive tudi RAPD.

IMUNOLOŠKI SKLOP:

Merjenje interakcij hpLPS – CD14 – katepsin X s pretočno citometrijo, merjenje količine citokinov pri s *H.pylori* okuženih ljudeh s pretočno citometrijo; uporaba verižne reakcije s

polimerazo in sekveniranja v analizi sev specifičnih hpLPS, uporaba verižne reakcije s polimerazo v analizi razlik izločanja citokinov pri ljudeh, okuženih s *H. pylori*; določevanje protiteles in sestavin komplementnega sistema v likvorju s tehnikami ELISA; merjenje protiteles proti glivam in citokinov v serumu bolnikov s sakroidozo; merjenje citokinov v supernatantih kultur s tehnikami ELISA; merjenje IL-17 s tehniko ELISA; merjenje Th17 s pretočno citometrijo, izolacija humanih mononuklearnih celic (PBMC) iz levkocitnih koncentratov in priprava primarnih kultur; aktivacija in stimulacija PBMC v kulturah z aktivatorji vnetnih in imunskih odzivov in s polisaharidi gob, gojenih v različnih pogojih.

VIROLOŠKI SKLOP:

Za dokazovanje virusnih povzročiteljev je nujna uporaba molekularno-bioloških metod, kot so: RT-PCR, (RT-)PCR v realnem času, metoda reverznega dot-blot in metoda encimske restrikcije pridelkov verižne reakcije s polimerazo (PCR), določanje in analiza nukleotidnega zaporedja. V zadnjih letih je z razvojem tehnologij omogočena uporaba multipleks molekularnih reakcij, ki omogočajo hkratno detekcijo praktično vseh znanih virusnih povzročiteljev. Zaradi genetske pestrosti virusov in neznane molekularne epidemiologije na področju Slovenije pa je pred uvedbo takih metod potrebna predhodna analiza. Ta bo vključevala široko zasnovano detekcijo virusnih povzročiteljev povezano z molekularnimi tipizacijskimi metodami. Uporabili bomo tudi različne metode transmisijske elektronske mikroskopije. Za določevanje citokinov bomo uporabljali encimskoimunske teste.

SKLOP ZOONOZE:

Za raziskave zoonoz bomo uporabljali mikroskopiranje (svetlobno, fluorescenčno), različna barvanja, gojenje mikroorganizmov na celičnih kulturah ali na poskusnih živalih, v kolikor ni druge možne alternativne metode kultivacije. Uporabili bomo tudi serološke teste kot so: indirektna hemaglutinacija (IHA), posredna imunofluorescenca za ugotavljanje prisotnosti protiteles (IFA), encimska reakcija (ELISA) in Western blot (WB). Poleg tega bomo uporabljali tudi molekularno biološke metode: ekstrakcijo NK, PCR in PCR v realnem času, HRM za dokazovanje SNP mutacij, kloniranje, sekveniranje in mikromreže.

7. Pomen za razvoj znanosti:

BAKTERIOLOŠKI SKLOP:

Nameravamo prispevati podatke o odpornosti bakterij proti antibiotikom in njihovih mehanizmih. Ker so nekatere bakterije že odporne proti večini antibiotikov, se bomo vključili v odkrivanje novih protimikrobnih spojin. Pri patogenezi endokarditisa in sepse želimo prispevati novosti pri identifikaciji bakterij in s tem pri odkrivanju novih možnih povzročiteljev. Z novimi, bolj občutljivimi metodami želimo dokazovati povzročitelje sepse (ki je življenje ogrožujoča okužba), ki jih je v krvi malo, vendar je njihov dokaz zelo pomemben za pravilno in pravočasno zdravljenje. Z ugotavljanjem virulentnih dejavnikov uroseptičnih *E. coli* bomo prispevali k preučevanju patogeneze, dejavnikov tveganja za okužbo in k morebitnemu razvoju cepiv. S tipizacijo MRSA, VRE, *Klebsiella* spp. ESBL, *Stenotrophomonas maltophilia*, itd. bomo razjasnjevali bolnišnične izbruhe in ugotavljali izvor in poti širjenja odpornih klonov-rezultati bodo uporabni za načrtovanje bolj učinkovitih in racionalnih ukrepov za preprečevanje in obvladovanje bolnišničnih okužb. V določenem časovnem obdobju bomo s tipizacijo *spa* ugotavljali število in frekvenco posameznih klonov med izolati *S. aureus* iz hemokultur v Sloveniji, ki jim bomo kasneje določili še MLST tip in ugotovili v okviru projekta EARSS oz. mreže Seq.Net, ali gre za epidemične ali posebno virulentne klone. Na podoben način bomo raziskovali epidemiologijo CA-MRSA. Pri *Chlamydia trachomatis* želimo ustvariti zbirko slovenskih genotipov, kar nam omogoča primerjavo z ostalo Evropo in svetom. Pri *Aspergillus fumigatus* želimo ugotoviti, ali so določeni genotipi iz okolja bolj virulentni od drugih.

IMUNOLOŠKI SKLOP:

Z dokazom sev-specifičnih vplivov LPS-a iz *H. pylori* (hpLPS) na patogenezo okužbe in uspeh terapije bomo opredelili pomen hpLPS kot morebitnega novega virulenčnega

dejavnika *H. pylori* – poleg že znanih (CagA in VacA). Uveljavili bomo model interakcije hpLPS – CD14 - katepsin X na celicah THP-1 kot enostaven *in vitro* patogenetski model za merjenje vpliva molekul PAMP na procese naravne odpornosti v želodčni sluznici. Vloga komplementa pri vnetju centralnega živčnega sistema je slabo poznana. Predvidevajo, da možganske celice same proizvajajo posamezne sestavine, ki se nato lahko v kaskadni reakciji združijo v terminalni kompleks. Dokaz navedene hipoteze bi pomembno razjasnil vlogo naravne odpornosti pri boleznih CŽS. Sarkoidoza je pri nekaterih bolnikih težko obvladljiva bolezen. Če bo naša hipoteza potrjena in bomo lahko dokazali povezavo med glivami ter njihovimi sestavinami in imunskimi odzivi bolnikov s sarkoidozo, bomo s tem osvetlili del imunopatogeneze te kronične vnetne bolezni. S študijo o vplivu polisaharidov iz gob na imunске odzive se priključujemo raziskovalcem, ki iščejo nove biološko aktivne snovi naravnega izvora.

VIROLOŠKI SKLOP:

S sistematično raziskavo molekularne epidemiologije virusnih okužb dihal v Sloveniji bomo lahko interpretirali danes še nepopolnoma jasne vloge posameznih virusnih povzročiteljev pri okužbah dihal v zgodnjem otroštvu in nastanku astme, kakor tudi pri okužbah pri starostnikih in imunsko oslabiljenih bolnikih. Z zbiranjem ključnih molekularnih in molekularno-epidemioloških podatkov novoporajajočih se enteričnih virusov bi lahko natančneje opredelili pomen vodnih virov pri kroženju nekaterih enteričnih virusov v okolju, izdelali nove podatkovne genske zbirke enteričnih virusov iz našega slovenskega okolja ter spoznali in razumeli virusno evolucijo proučevanih virusov. Z določanjem nukleotidnega zaporedja predhodno delno opredeljenih slovenskih izolatov HPV in določanje nukleotidnega zaporedja celotnega genoma genetsko najbolj raznolikih izolatov bomo najverjetneje opredelili najmanj en novi genotip HPV. Z načrtovanim delom na področju parenteralno prenosljivih virusov bomo med prvimi v Evropi molekularno-epidemiološko na nacionalnem nivoju opredelili veliko število izolatov virusa hepatitisa C ter virusa hepatitisa B in s tem pomembno prispevali k naporom za zaježitev eksplozivnega širjenja parenteralno prenosljivih virusnih okužb v tem delu Evrope. Raziskave vloge citokinov v patogenezi virusnih hemoragičnih mrzlic bodo prispevale k boljšemu razumevanju patogeneze, klinične slike in poteka proučevanih virusnih hemoragičnih mrzlic in s tem k izboljšanju terapije in morebitnemu preprečevanju bolezni.

SKLOP ZOONOZE:

Z raziskavami bomo uvedli oz. izboljšali določene metode za diagnostiko zoonoz ter odkrili morebitne nove genotipe mikroorganizmov razširjenih v Sloveniji. Razvite metode bodo uporabne tudi v inštitucijah po Evropi ali drugod po svetu. Na osnovi pridobljenih rezultatov o genetski variabilnosti in drugih socialno-ekonomskih podatkih bomo pripomogli k pripravi novih napovednih modelih o razširjanju obstoječih ali novih zoonoz v Sloveniji in Evropi. S preučevanjem imunopatogeneze bomo pripomogli k razumevanju imunopatogenetskih mehanizmov in prispevali k razvijanju novih zdravil ali cepiv.

8. Pomen za družbeno-ekonomski in kulturni razvoj Slovenije¹:

BAKTERIOLOŠKI SKLOP:

Spremljanje odpornosti bakterij na nivoju Slovenije je zelo pomembno za področje zdravljenja in preprečevanja infekcijskih bolezni. Rezultati v okoljih z visoko stopnjo odpornosti kažejo na potrebo po uvedbi ukrepov s strani države. Rezultati omogočajo načrtovanje ustrezne empirične in usmerjene terapije bakterijskih okužb. Kažejo potrebo

Obseg teksta v rubrikah I.B.5 do I.B.11 je skupaj lahko največ 7 strani (font:11, enojni razmik)

¹ Neposredni pomen programa za gospodarstvo in družbo, za gospodarsko panogo/e, za družbeno infrastrukturo, za javno upravo, za kulturni razvoj, za varovanje naravne in kulturne dediščine. Posredni pomen za družbo (promocija države, dostopanje do tujih znanj, vključevanje v mednarodno delitev dela, vzgoja kadrov), pomen za razvoj stroke in inženirske prakse.

po uvedbi oz. poostitvi ukrepov za preprečevanje prenosa povzročiteljev okužb. Omogočajo smiselno rabo antibiotikov in dajejo osnove za regulacijo dostopnosti uporabnikov do različnih protimikrobnih zdravil. Na področjih visoke pojavnosti in odpornosti kažejo na potrebe po odkrivanju novih protimikrobnih spojin in po uvedbi cepiv. Tipizacija bakterij nam omogoča odkrivati razširjenost klonov, nove klone z novimi lastnostmi, in primerjati širjenje klonov v državi in med državami, ter omogoča pravilno načrtovati in izvajati ukrepe za preprečevanje prenosa okužb.

IMUNOLOŠKI SKLOP:

H. pylori je pomemben povzročitelj želodčnega raka. Ker je okužba v Sloveniji zelo pogosta (nad 50% ljudi), so potrebne patogenetske študije glede nastanka kroničnega vnetja in želodčnega raka v odvisnosti od lastnosti gostitelja in od seva povzročitelja – da bi odgovorili na vprašanje, v katerih primerih je potrebno okužbo pozdraviti z antibiotiki zaradi preventive želodčnega raka. Če bomo lahko dokazali povezavo med glivami ter njihovimi sestavinami in imunskimi odzivi bolnikov s sarkoidozo, bomo s tem potrdili smiselnost antimikotične terapije pri bolnikih s sarkoidozo in senzibilizacijo na glive. S proučevanjem polisaharidov iz gob, ki jih gojijo v Sloveniji na različne načine, lahko sodelujemo pri izdelavi protokolov za gojenje gob, ki bodo vsebovale več biološko aktivnih polisaharidov.

VIROLOŠKI SKLOP:

Z dobljenimi raziskovalnimi rezultati bomo podrobneje proučili procese spreminjanja enteričnih virusov. Določili bomo pomen vodnih virov pri kroženju različnih enteričnih virusov v naravi in ugotavljali vpliv onesnaženih voda na zdravje in kakovost življenja ljudi, s čimer bomo dosegli večjo osveščenost ljudi o pomenu enteričnih virusov v hrani in vodi in njihovem vplivu na zdravje. Z molekularno opredelitvijo manjših epidemij povzročenih s parenteralno prenosljivimi virusi ter z razjasnitvijo vzrokov naraščanja odpornosti na protivirusna zdravila bomo pomembno prispevali k razreševanju številnih problemov v zvezi s preprečevanjem pojavljanja in širjenja parenteralno prenosljivih virusnih okužb v Sloveniji.

SKLOP ZOONOZE:

Z raziskavami bomo bolje spoznali določene zoonotske agense, njihovo ekologijo, epidemiologijo in njihovo pogostnost v določenih regijah Slovenije. Ti podatki bodo pomagali raznim službam javnega zdravstva, ki skrbijo za preprečevanje in nadzor širjenja nalezljivih bolezni pri nas. Le na osnovi pravilne in učinkovite diagnostike različnih zoonotskih agensov bomo lahko tudi sodelovali z ministrstvom za obrambo in nudili strokovno svetovanje in ukrepanje v primeru napada z orožji ali sredstvi za množično uničevanje ter s klasičnimi terorističnimi sredstvi. Z nacionalno zbirko izolatov posameznih zoonotskih agensov, ki krožijo v Sloveniji, bomo prispevali k večjemu vedenju o razširjenosti in pogostnosti teh agensov in njihovih različic v Sloveniji.

9. Vpetost vsebine v obstoječe institucionalne, nacionalne in mednarodne raziskovalno-razvojne programe in projekte:

Različne raziskave programske skupine bodo vpete v različne nacionalne in mednarodne raziskovalno-razvojne programe in projekte:

Evropski projekti FP6:

EDEN - Emerging Disease in a Changing European Environment - FP6 IP GOCE (Contract No. 010284)

PathogenCombat - Control and Prevention of Emerging and Future Pathogens - FP6 IP Food Quality and Safety (Contract No. 007081)

ICTTD-3 - Integrated Consortium on Ticks and Tick-borne disease - FP6 CA INSERA-INCO (Contract No. 510561)

RiViGene - Genomic inventory, forensic markers. – FP& SSPE-CT-2005-022639 EVENT (Enteric Virus Emergence, New tools): Providing tools to prevent the emergence of enteric viruses (CP-CT-2004-502571)

EuropeHIVResistance FP6-LSHP-CT-2006-518211

Mednarodni projekti

ENIVD - European Network of Imported Viral Disease - DG SANCO (Contract No. 2004206)

DIVINE-NET Prevention of emerging (food borne) enteric viral infections. Health and consumer protection DG SANCO (Contract No. 790965)

EU-ROTA-NET: "Rotavirus Surveillance in Europe: Determining the Diversity of Co-circulating Rotavirus Strains in Consecutive Rotavirus Seasons"

EARSS- European Antimicrobial Resistance Surveillance System (agreement SI2.123794, contractor National Institute of Public Health and Environment, Bilthoven, Nizozemska), (www.earss.rivm.nl)

ESSTI - European Surveillance of Sexually transmitted Infections (Contract No. 2004210)

Eureca: E12814 - A New Therapeutic Method for Sports Medicine Using a Combination of New Combined Laser Therapeutic Device with Adequate Therapies and Limited Quantities of Corresponding Drugs

Mednarodno sodelovanje:

COST št. 929 "A European Network for Environmental and Food Virology"

Sodelovanje v evropski mreži SeqNet.org

Enter-net-mreža na področju javnega zdravja v Evropski uniji, ki nadzoruje tri glavne črevesne patogene bakterije

SYROCOT (Systematic Review of Congenital Toxoplasmosis) of Cochrane Collaboration

CRP- Znanje za varnost in mir:

M3-0035 Vpliv ekstremnih naporov in poškodb na imunsko stanje in obolevnost za okužbami

M2-0117 Univerzalna laserska medicinska naprava XD-3

M3-0143 Računalniška baza za podporo obrambi proti bioterorizmu

M1-0145 Razvoj metod za določanje virusov v pitnih vodah v primeru terorističnega napada in naravnih nesrečah

Pogodbe o raziskovalno razvojnem sodelovanju z ministrstvi:

MORS-URZS - Strokovno svetovanje in ukrepanje v primeru napada z orožji ali sredstvi za množično uničevanje ter s klasičnimi terorističnimi sredstvi (šifra - 404-09-35/2006-1)

MZZ-SZO - Delovanje kolaborativnega centra za arboviruse in hemoragične mrzlice (pogodba 2711-06-2274-01)

10. Časovni potek programa:

2009 - zbiranje bakterijskih izolatov in podatkov o bolnikih; izdelava eksperimentalnih modelov, ki naj bi s tehnološkega vidika potrdili možnosti za izvedbo raziskav; zbiranje literature in pregled obstoječih protokolov za detekcijo človeških in živalskih virusov iz kužnin, hrane in vode; izdelava delovnih protokolov za detekcijo različnih virusov; priprava protokolov za detekcijo zoonotičnih agensov iz kužnin in vzorcev živali ter naravnih prenašalcev. Priprava letnega poročila o rezultatih dela.

2010 - identifikacija in testiranje občutljivosti/odpornosti bakterijskih sevov, analiza kliničnih in epidemioloških podatkov, izbira primernih metod (PCR, PFGE, klasično sekveniranje), prenos novih metod (pirosekveniranje) v državo, priprava reagentov, uvajanje novih metod; zbiranje sevov *H. pylori* izoliranih iz okuženih bolnikov, zbiranje vzorcev krvi bolnikov z nevrosifilisom in s sarkoidozo, vzorcev krvi kontrolnih skupin ter vzorce potencialnih biološko aktivnih snovi; testiranje zbranih virusnih sevov; genotipizacija; priprave na izdelavo podatkovne baze; terensko delo (zbiranje vzorcev v naravnem okolju). Sprotno poročanje o novih dognanjih na strokovnih srečanjih in v strokovni literaturi. Priprava letnega poročila o rezultatih dela.

2011 - analiza zbranih izolatov z najprimernejšimi metodami, primerjanje rezultatov dobljenih z novimi metodami z rezultati, pridobljenimi s klasičnimi metodami; preizkušanje vzorcev v izbranih eksperimentalnih modelih; sekvenčna analiza zbranih človeških in

živalskih virusnih sevov; nadaljevanje terenskega dela in sprotno testiranje ter začetne genetske študije. O rezultatih bomo sproti poročali na strokovnih srečanjih in v strokovni literaturi. Priprava letnega poročila o rezultatih dela.

2012 - obdelava podatkov, primerjanje rezultatov znotraj države (podatki o razširjenosti in naravi različnih patogenih mikroorganizmov so osnova za javnozdravstvene ukrepe, ki se morajo odraziti v zmanjšanju števila okužb (predvsem hospitalnih) v zmanjšani porabi antibiotikov in so podlaga za ciljno uporabo protivirusnih zdravil pri kritično bolnih pacientih; poglobljeno testiranje na izbranih modelih in analiza rezultatov; primerjalna sekvenčna analiza in študija rekombinacij; študij genetske variabilnosti in patogeneze nastanka bolezni. Sprotno poročanje o novih dognanjih na strokovnih srečanjih in v strokovni literaturi. Priprava letnega poročila o rezultatih dela.

2013 - vključevanje in primerjanje rezultatov med državami v Evropi in drugod po svetu; dodatno testiranje izbranih vzorcev iz kliničnih materialov bolnikov z nepojasnjeno etiologijo infekcijskih bolezni; priprava nacionalne zbirke zoonotičnih agensov in genske banke patogenih mikroorganizmov vključenih v raziskave. Poročanje o rezultatih na strokovnih srečanjih in v strokovni literaturi. Priprava letnega poročila o rezultatih dela.

2014 - končna analiza zbranih podatkov med šestletnim raziskovanjem in pisanje nacionalnih priporočil in navodil za uporabnike ter priprava zaključnega poročila o raziskovalnem delu programske skupine.

11. Poslanstvo, kontinuiteta dela (tradicija), organiziranost in vodenje programske skupine ter primernost raziskovalnega okolja (opišite kakšno je poslanstvo vaše programske skupine, kako ste temu poslanstvu sledili v preteklosti in kako ga nameravate realizirati s predloženim programom, kako bodo vsebine programa vpete v študijske programe, opišite kako dolgo programska skupina že deluje, kako se je kadrovsko spreminjala, kako je organizirana in vodena, opišite kakšno je raziskovalno okolje v katerem delujete v smislu povezav z drugimi raziskovalnimi skupinami znotraj institucije in izven):

Programska skupina »Odnosi parazitskega obstajanja« je vodilna raziskovalna skupina v Sloveniji, ki s svojim visoko kvalitetnim raziskovalnim delom nenehno skrbi za razvoj in napredek na področju mikrobiologije in imunologije. Skupina, ki deluje že drugo desetletje, je s dosedanjimi rezultati znatno prispevala k razvoju stroke in raziskav tako v ožjem (Slovenija) kot v širšem prostoru (Evropa, svet). V minulem petletnem raziskovalnem obdobju smo raziskovalci skupine objavili izsledke posamičnih raziskav v skupno 167 strokovno-znanstvenih člankih v mednarodnih revijah, ki jih indeksira SCI. Svoje izsledke temeljnih raziskav smo učinkovito prenašali na aktualne potrebe gospodarstva, družbe in okolja. Hkrati skrbimo za sproti prenos raziskovalnih dosežkov v prakso. Raziskovalno delo programske skupine ima znaten vpliv na razvoj dodiplomskega in podiplomskega pouka iz širšega področja biomedicinskih znanosti, ki se vrši na različnih fakultetah Univerze v Ljubljani (Medicinska fakulteta, Biotehniška fakulteta, Fakulteta za farmacijo, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo). V sklopu dodiplomskega študija je v minulih letih v laboratorijih MF-IMI, pod mentorstvom raziskovalcev programske skupine, opravilo diplomsko delo 78 študentov. Programsko skupino sestavlja vedno 20 raziskovalcev različnih osnovnih profilov, ki se zaradi upokojitve zamenjujejo z mladimi, v skupini vzgojenimi raziskovalci. Ker je skupina kompleksna, smo sodelujoči organizirani v področne sklope s področnimi koordinatorji. Celotna skupina ima poleg rednih, mesečnih srečanj in poročanj o delu, tudi letni sestanek s prikazom in analizo rezultatov. Raziskovalno okolje je zelo kvalitetno, z vso sodobno tehnološko infrastrukturo, ki zagotavlja uspešno delo in razvoj. Učinki kvalitetnega dela se poleg številnih objav kažejo tudi z mnogimi vabljenimi predavanji na domačih in mednarodnih srečanjih ter bilateralnimi in multilateralnimi programi, vključenostjo v programe 6.OP EU ter številne evropske in svetovne mreže.