



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

Fakulta potravinářské a biochemické technologie

Ústav analýzy potravin a výživy



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Vít Kosek, Vladimír Kocourek, Jana Hajšlová

**Metoda metabolického fingerprintingu
pro autentikaci biologického původu masa**

Praha, listopad 2017

Dedikace:

Uplatněná certifikovaná metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. QJ1530272 (Komplexní strategie pro efektivní odhalování falšování potravin v řetězci (prvo)výroba-spotřebitel) a dále byla tato práce realizována v rámci “Operačního programu Praha - Konkurenceschopnost” (CZ.2.16/3.1.00/21537 a CZ.2.16/3.1.00/24503) za podpory “Národního programu udržitelnosti I” - NPU I (LO1601 - č.: MSMT-43760/2015).

OBSAH

1	CÍL METODIKY	4
2	TEORETICKÝ ÚVOD	5
3	VLASTNÍ POPIS METODIKY	6
3.1	Použitelnost metody	6
3.2	Princip metody	6
3.2.1	Princip metody REIMS	6
3.3	Bezpečnost práce	7
3.3.1	Chemikálie a spotřební materiál	7
3.4	Přístroje a zařízení	8
3.5	Použitý software	8
3.6	Pracovní postup	8
3.6.1	Příprava přístroje k měření	8
3.6.2	Příprava vzorku	8
3.6.3	REIMS analýza	9
3.7	Tvorba modelu a klasifikace neznámých vzorků	10
3.7.1	Vytvoření statistického modelu	10
3.7.2	Klasifikace neznámých vzorků	12
3.8	Pracovní charakteristiky metody	13
3.8.1	Opakovatelnost metody	13
3.8.2	Selektivita metody	13
3.8.3	Robustnost metody	14
4	SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	15
5	POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	16
6	EKONOMICKÉ ASPEKTY	17
7	SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	18
8	SEZNAM PUBLIKACÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍCH METODICE	19
	AUTOŘI A OPONENTI	20

1 CÍL METODIKY

Jedním z dílčích cílů projektu QJ1530272 podporovaného Ministerstvem zemědělství České republiky bylo vyvinout a následně validovat metodu pro necílovou analýzu (fingerprinting) a metabolické profilování sloužící pro určení biologického původu masa. Metoda využívá ambientní hmotnostní spektrometrie s ionizací typu REIMS (Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry), kdy jsou vzorky svaloviny (masa) řezány elektroskalpelem (electrosurgical knife) a uvolněný „kouř“ je analyzován *in situ* hmotnostním spektrometrem. Byl splněn další cíl, byla vytvořena databáze hmotnostně-spektrometrických záznamů vzorků kuřecího a vepřového masa, která posloužila pro tvorbu chemometrického modelu s vysokou predikční a rozpoznávací schopností. Statistický model je zároveň připraven pro zahrnutí dalších druhů masa.

Vypracovaná metodika bude dále předána pracovníkům kontrolních laboratoří, pro možné využití při laboratorní kontrole biologického původu masa.

2 TEORETICKÝ ÚVOD

Mezi časté způsoby falšování masných výrobků patří přidavek bílkovin z jiných (levnějších) zdrojů, jako je sója, syrovátka či krevní plazma, aniž je spotřebitel o tomto faktu náležitým způsobem informován. Dalším častým způsobem je vydávání méně hodnotného druhu masa za hodnotnější, používání strojně odděleného masa (separátu) v nepovolené míře a v neposlední řadě sem můžeme zařadit i nesprávné označování místa původu masa nebo surovin pro výrobu masných výrobků.

Reakcí na různé způsoby falšování je neustálý rozvoj metod pro jejich odhalování. Hlavní metoda používaná pro druhové rozlišení použitého masa je PCR, založená na analýze DNA. Díky neustálému rozvoji „-omics“ technik, tzn. metabolomiky, proteomiky a lipidomiky se do popředí dostávají i jiné metody, hlavně chromatografické ve spojení s hmotnostně-spektrometrickou (MS) detekcí. Tou prozatím nejúspěšnější je proteomická analýza např. peptidů specifických pro daný živočišný druh [1]. Nevýhodou všech těchto technik je časová náročnost z důvodu náročné přípravy vzorku nebo instrumentální koncovky. Do popředí se tak dostávají ambientní techniky hmotnostní spektrometrie [2], u nichž je příprava vzorku značně redukována nebo dokonce eliminována, přitom mají potenciál poskytovat spolehlivé výsledky. Jednou z těchto technik je ionizace vzorku metastabilními částicemi helia, komerčně nazývaná DART [3]. Nedávným pokrokem v ambientních hmotnostně-spektrometrických technikách je spojení elektroskalpelu jako iontového zdroje s hmotnostním spektrometrem, které bylo původně vyvinuto pro klinické účely, zejména při chirurgii zhoubných nádorů [4], kdy je potřeba během výkonu získat rychle potřebnou informaci o složení dané tkáně. Aplikace této metody nacházejí své místo i v oblasti analýzy potravin, kdy mohou sloužit např. ke speciaci masa ať už savců [5] či ryb [6].

3 VLASTNÍ POPIS METODIKY

3.1 POUŽITELNOST METODY

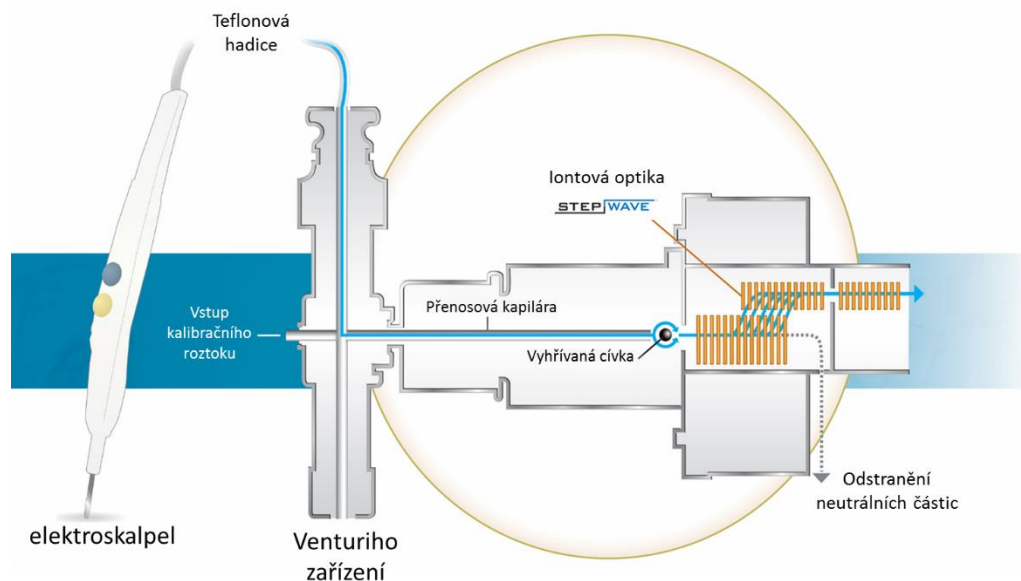
Aplikace metabolomického fingerprintingu pomocí ambientní hmotností spektrometrie se jeví jako perspektivní metoda, především z důvodu minimální náročnosti na přípravu vzorku, vysoké selektivity a možnosti získání informace o vzorku prakticky v reálném čase. Klasifikace neznámého vzorku se odvíjí od zhodnocení naměřených dat pomocí chemometrického modelu vytvořeného na základě primárních dat získaných analýzou fingerprintů souboru autentických vzorků. Pro klasifikaci vzorků do tříd jsou v tomto případě důležité především profily (relativní intenzity) anionických fosfolipidů (např. fosfatidylserinů).

3.2 PRINCIP METODY

Metoda je určena pro analýzu profilu anionických fosfolipidů s molekulovou hmotností mezi 600 a 950 Da, ionizovatelných pomocí elektrochirurgického skalpelu, který slouží jako ionizační zdroj pro vysokorozlišovací hmotnostní spektrometr typu kvadrupól-analyzátor doby letu (Q-TOF). Metoda je aplikovatelná na pevné matrice s obsahem vlhkosti do cca 80 % (vzorky musí vykazovat dostatečnou vodivost). Výstupem analýzy je hmotnostní spektrum vzorku (histogram četnosti detekovaných iontů o určité hodnotě m/z). Použitá technika umožňuje přiřadit vybraným iontům identitu na základě přesné hmoty, pro klasifikaci vzorků to však není zásadní.

3.2.1 Princip metody REIMS

Principem metody je ionizace tkáňových lipidů během řezu elektrochirurgickým skalpelem a následná chemická analýza generovaného kouře v hmotnostním spektrometru. Elektroskalpel je napájen generátorem, který mu dodává proměnný proud o frekvenci 550 kHz. Vzorek je položen na kovovou podložku, která je rovněž spojena s generátorem proudu. Při řezu elektroskalpelem do masa/tkáně dojde k uzavření elektrického obvodu, kde vzorek masa díky svému složení tvoří elektrický odpor. Následně se na čepeli nože generuje vysoká teplota, která umožňuje termodestrukci tkáně v bezprostředním okolí čepele. Při tomto procesu se do okolní atmosféry uvolňuje kouř obsahující složky tkáně. Tento kouř je následně pomocí Venturiho zařízení nasáván do hmotnostního spektrometru, kde jsou přítomné ionty deklastrovány na vyhřívané cívice a analyzovány v detektoru.



Obrázek č. 1: schematické znázornění iontového zdroje REIMS.

V programu Abstract model builder (Waters) je od získaného hmotnostního spektra vzorku odečteno pozadí, je korigováno na přesnou hmotu LeuEnk (m/z 554,2615) a plochy píků iontů v rovnoměrně rozdělených úsecích ($0,5 m/z$) hmotnostní osy jsou zprůměrovány (Data binning). Tím je docíleno nižší komplexity a normalizace dat. Z takto zpracovaných dat je vytvořen pomocí daného softwaru statistický model pomocí lineární diskriminační analýzy (LDA). Tento model je načten navazujícím softwarem AMX recognition, který slouží ke klasifikaci spekter z neznámých vzorků a to i ve chvíli, kdy jsou zaznamenávána přímo na měřicím přístroji (tzv. online modu).

3.3 BEZPEČNOST PRÁCE

Při přípravě přístroje k měření je třeba dodržovat základní pravidla bezpečnosti práce v laboratoři. V případě kontaktu s pokožkou či očima mohou organická rozpouštědla způsobovat podráždění. Proto je nezbytné pracovat v laboratorních rukavicích během celé přípravy vzorků. Samotné řezání vzorků je nutné provádět v digestoři z důvodu toxicity produkovaného kouře.

3.3.1 Chemikálie a spotřební materiál

- 2-propanol, Merck (Německo)
- Technický plyn: dusík (99,994 %), Technoplyn (ČR)
- Leucine-Enkephaline, Waters (USA)

3.4 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ

- Automatické pipety, TraffLab-Transferpette® (Švýcarsko)
- REIMS systém:
 - REIMS iontový zdroj, Waters (USA)
 - Elektrochirurgická jednotka VIO 50c, ERBE (Německo)
 - hmotnostní spektrometr Xevo G2-XS Q-TOF, Waters (USA)

3.5 POUŽITÝ SOFTWARE

- Mass Lynx, Waters (USA)
- Abstract model builder, Waters (USA)
- AMX Recognition, Waters (USA)

3.6 PRACOVNÍ POSTUP

3.6.1 Příprava přístroje k měření

Pro zajištění kvality dat je před měřením a během každých cca 2-3 hodin měření třeba rozebrat Venturiho zařízení, mechanicky očistit vnitřní prostory jemným kartáčem a jednotlivé komponenty sonikovat na ultrazvuku po dobu 5 minut v roztoku 2-propanolu. Před samotným měřením je nutné přístroj kalibrovat pomocí roztoku mravenčanu sodného o koncentraci 1000 ng/mL a to pomocí fluidiky hmotnostního spektrometru. Kalibrace probíhá automaticky pomocí algoritmu zabudovaného v měřicím softwaru. Po kalibraci je roztok mravenčanu sodného vyměněn za roztok LeuEnk a tento nasáván do Venturiho zařízení průtokem 0,1 mL/min během celého měření. Pro dosažení dostatečné opakovatelnosti měření je třeba nechat takto připravený přístroj nejprve stabilizovat cca 30 minut. Potřebná nastavení hmotnostního spektrometru popisuje **Tabulka I**.

3.6.2 Příprava vzorku

Před samotným měřením vzorku se nejprve položí papírová utěrka na kovovou podložku v digestoři, jež je součástí REIMS zdroje, a tato utěrka je navlhčena deionizovanou vodou. Vzorek (cca 15 g) mletého masa či homogenátu se zformuje do útvaru o rozměrech přibližně $5 \times 5 \times 0,5$ cm, položí na navlhčenou utěrku a navlhčí se deionizovanou vodou ze stříčky.

3.6.3 REIMS analýza

Na připraveném vzorku je provedeno několik řezů elektroskalpelem na nastavení Autocut (40 W). Nezáleží na směru řezu, je však nutné provést větší počet řezů z důvodu případné nehomogenity vzorku (viz **Obr. 2**).

Tabulka I: Parametry nastavení hmotnostního spektrometru a podmínky detekce

Ionizační technika	REIMS -
Výkon nože při AutoCut modu	40 W
Teplota vyhřívání cívk	800 °C
Rozsah hodnot m/z	100 – 1200
Potenciál na vstupu	40 V
Potenciál na vyhřívání cívk	80 V
Mod rozlišení	Sensitivity (FWHM cca 15000 při m/z 600)

Kalibrace hmotnostního spektra na přesnou hmotu probíhá v rámci úprav spektra v programu Abstract Model Builder a kalibrační hodnotou je signál Leucin-Enkephalinu o m/z 554,2615.

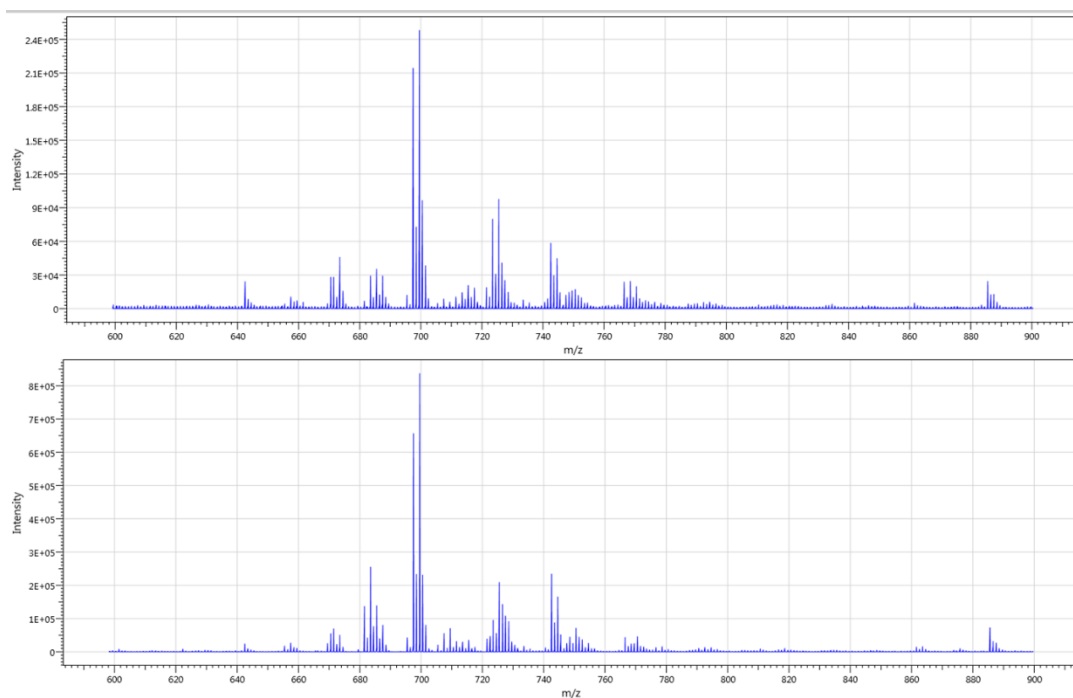


Obrázek č. 2: Příklad řezů homogenátu kuřecího masa elektroskalpelem.

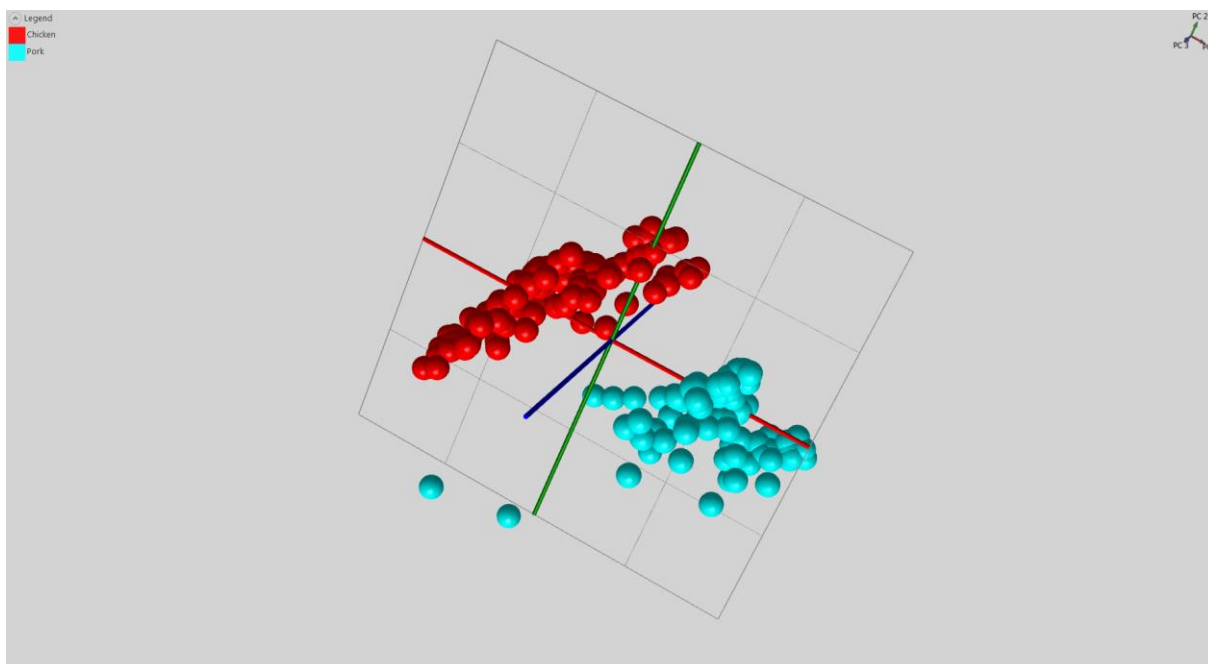
3.7 TVORBA MODELU A KLASIFIKACE NEZNÁMÝCH VZORKŮ

3.7.1 Vytvoření statistického modelu

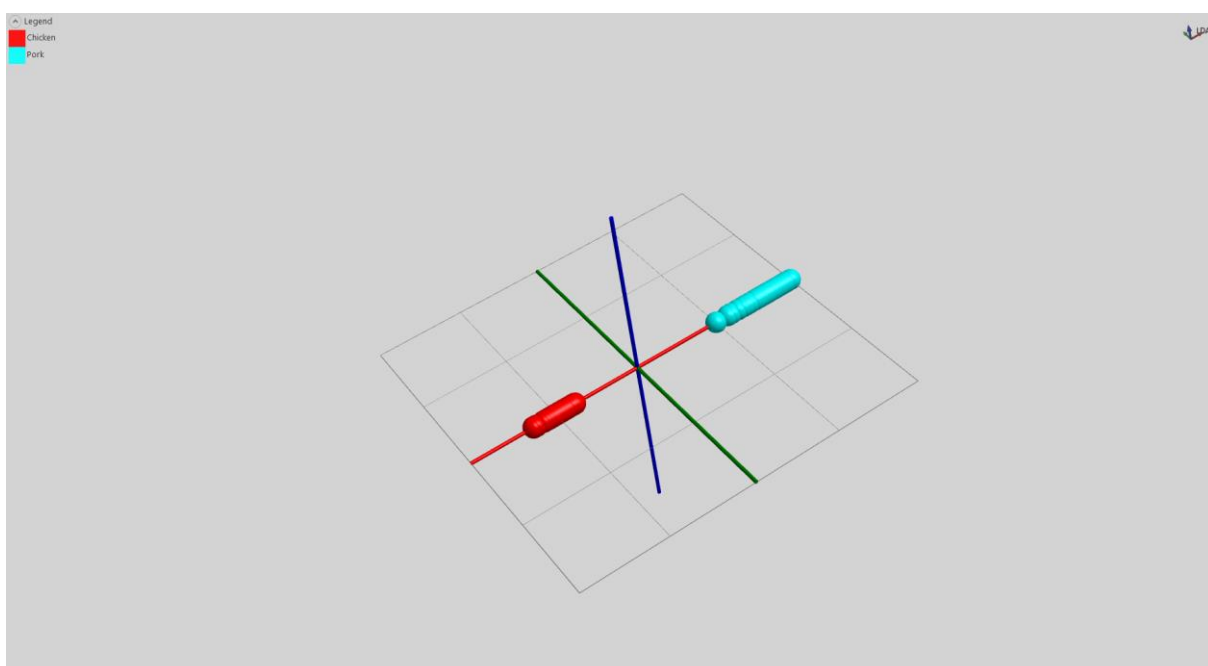
K vytvoření statistického modelu dochází v softwaru Abstract Model Builder (AMX). V něm dochází nejprve k předúpravě dat, tzv. binningu. Takto upravená spektra jsou použita pro vytvoření statistického modelu pomocí lineární diskriminační analýzy (LDA), nastavení tohoto modelu jsou uvedena v **Tabulce IV**. Spektra jsou automaticky korigována na referenční hmotu, normalizována a je z nich odečteno pozadí.



Obrázek č. 3: Příklady REIMS spekter oblasti anionických fosfolipidů získaných pro A) kuřecí maso, B) vepřové maso



Obrázek č. 4: Příklad získaného PCA-DA modelu pro rozlišení kuřecího (červená) a vepřového (akvamarínová) masa; každý bod odpovídá jednomu řezu



Obrázek č. 5: LDA model vytvořený pro klasifikaci vepřového (akvamarínová) a kuřecího (červená) masa

Tabulka II: Příklad optimálního nastavení statistického modelu v programu Abstract Model Builder

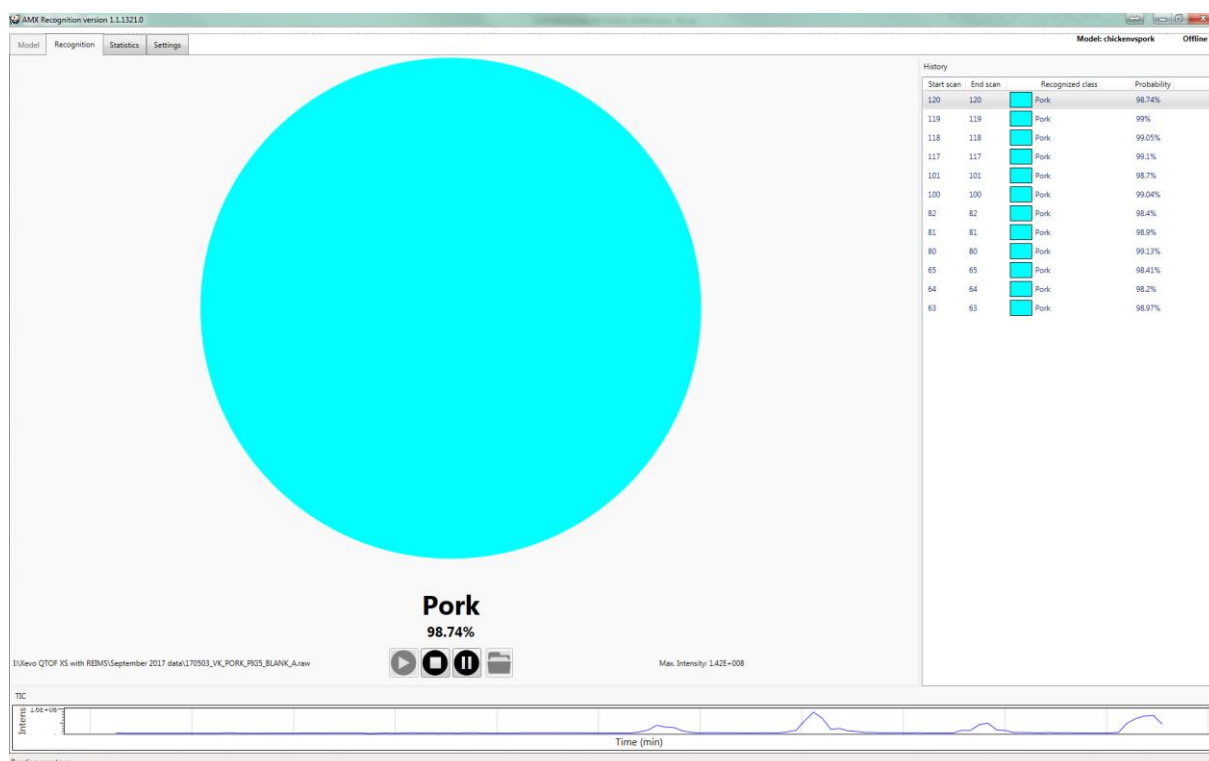
Algoritmus diskriminační analýzy	LDA
Rozsah hodnot m/z	600 - 900
Šířka binu	0,5 m/z
Typ binningu	advanced
Počet PCA rozměrů	5
Počet LDA rozměrů	1 (počet tříd -1)
Intenzitní limit	10^6
Referenční hmota	LeuEnk; m/z 554.2615

3.7.2 Klasifikace neznámých vzorků

Pro klasifikaci neznámých vzorků slouží software AMX Recognition, který načte vytvořený statistický model a poté jej aplikuje na:

1. soubory z dřívějších měření neznámých vzorků po jejich načtení do tohoto programu
2. spektra právě měřená

Příklad takové klasifikace je na **Obr. 3**. V programu AMX Recognition se zobrazí barevný kruh se třídou právě analyzovaného vzorku spolu s pravděpodobností přiřazení.



Obrázek č. 6: Příklad správné klasifikace vzorku vepřového masa pomocí softwaru AMX Recognition

3.8 PRACOVNÍ CHARAKTERISTIKY METODY

3.8.1 Opakovatelnost metody

Tento parametr je zahrnut v algoritmu pro vytvoření statistického modelu. Je podmíněn stavem měřicího systému a za vyhovující je opakovatelnost považována, pokud za daných podmínek dojde ke správné klasifikaci kontrolních (QC) vzorků masa.

3.8.2 Selektivita metody

Selektivita metody se odvíjí od statistického modelu sestaveného ke klasifikaci masa. V případě modelu pro klasifikaci vepřového a kuřecího masa je predikční schopnost téměř 100 %. Při rozšiřování modelu o další druhy masa je nutné posoudit, zda nejsou některé druhy mas ve statistickém modelu příliš blízko, pro zřetelnější klasifikace je vhodné vytvořit binární model schopný rozlišit tyto dva druhy.

3.8.3 Robustnost metody

Během zavádění metody byly identifikovány takové fáze pracovního postupu, které mohou výrazně ovlivnit výsledek stanovení. Jedná se především o operace související s instrumentální koncovkou.

- Před vlastní analýzou vzorků je nutné rozebrat Venturiho zařízení, pročistit ho jemným kartáčem a jednotlivé části zařízení sonikovat v roztoku 2-propanolu po dobu cca. 5 minut. Toto je potřeba opakovat po cca 2-3 hodinách měření.
- Pro zajištění přesného měření hmotnostním detektorem typu Q-TOF v průběhu celého měření je nutné detektor před začátkem analýzy kalibrovat a zajistit průtok LeuEnk do Venturiho zařízení v průběhu měření.

4 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Předkládaná metodika umožňuje provést rychlou a účinnou analýzu vhodnou k autentikaci biologického původu masa. Unikátnost vyvinutého postupu analýzy metabolického fingerprintingu tkví ve způsobu vyštření vzorku, při kterém dochází k ionizaci lipidů v tkáních pomocí elektroskalpelu a jejich následné detekce vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií. Dosavadní publikované metody chemické analýzy pro autentikaci masa spoléhají v současné době na proteomickou analýzu s využitím LC-MS/MS, která je ale poměrně zdoluhavá a finančně i odborně velice náročná. Velkou časovou a finanční náročností se vyznačují také metody založené na PCR. Tato inovativní metodika analýzy tkáňových lipidů, která nepotřebuje prakticky žádnou přípravu vzorku, poskytuje možnost „online“ určení biologického původu masa, což žádná z výše zmíněných konvenčních metod s takovouto průsazností a jednoduchostí (při dostatečné spolehlivosti) neumožňuje. V rutinní kontrole potravin se metoda založená na principu elektroskalpelu ve spojení s vysokorozlišovací QTOF-MS zatím ve světě nerozšířila, a tato aplikace je tedy zcela originální.

5 POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Uvedená metodika umožňuje rychlou speciaci mezi kuřecím a vepřovým masem, je však vhodná k odlišení i dalších druhů masa. Metoda byla primárně vyvinuta pro účely projektu **QJ1530272 – Komplexní strategie pro efektivní odhalování falšování potravin v řetězci (prvo)výroba – spotřebitel (2015-2018, MZE/QJ)**. Aplikace metody v rámci tohoto projektu významně přispěje k urychlení určení biologického původu masa, což je často časově náročný proces.

Smluvním uživatelem metodiky je Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI). Certifikovanou metodiku bude využívat při podezření na nesprávný původ masa. S ohledem na to, že provozní laboratoře (SZPI) nedisponují potřebným analytickým vybavením, předpokládá se pro analytickou část metodiky spolupráce s VŠCHT či instrumentálně odpovídajícím způsobem vybavenými komerčními laboratořemi formou služby. Uvedenou metodiku je vzhledem k jednoduchosti a rychlosti postupu také možné aplikovat v dalších státních i soukromých laboratořích a výzkumných centrech.

6 EKONOMICKÉ ASPEKTY

Předpokládané ekonomické a další přínosy jsou obsaženy v možnosti provádět rychlý cílový i necílový screening velkého počtu vzorků. Ekonomický přínos spočívá zejména v úspoře času na přípravu vzorku (postup přípravy je obvykle velmi jednoduchý a rychlý) a tedy i nákladů na provedení chemické analýzy vzorku.

Metoda využívá ambientní hmotnostní spektrometrie s ionizací typu REIMS, kdy jsou vzorky masné tkáně řezány elektroskalpelem a uvolněný kouř je analyzován *in situ* hmotnostním spektrometrem. Bereme-li v úvahu náklady na přípravu vzorku, kalibraci a přístrojový čas (nejvyšší položka), cena za vyšetření jednoho vzorku činí asi 1200-1500 Kč. Pro současné stanovení a identifikaci charakteristických proteinů v potravinách proteomickou analýzou s využitím LC-MS/MS je podle Vyhlášky č.132/2015 stanovena cena 3.495 Kč, což je o 2.295 Kč více. Při rutinním vyšetření 1000 vzorků ročně by úspora činila přibližně 2 - 2,2 mil. Kč. Cena elektroskalpelu včetně Venturiho pumpy s připojením na vysokorozlišovací hmotnostní spektrometr typu Q-TOF činí asi 150 tis. Kč, cena instalace, zprovoznění a verifikace celého systému, včetně měření referenčních na kontrolních vzorků se odhaduje přibližně do 80 tis. Kč.

Podle ceníku zkušební laboratoře pro identifikaci GMO a DNA fingerprinting (VÚRV Praha v.v.i.) se ceny analýzy pohybují mezi 5 000 – 15 000 Kč (bez DPH). Provozní náklady na zde navrženou metodu REIMS by neměly překročit 1 500 Kč, což znamená úsporu nejméně 3 500 Kč na analýzu. Při zpracování 1000 vzorků ročně je úspora 2,5 mil. Kč.

Díky velice jednoduchému a spolehlivému měření s extrémně rychlou odezvou bude nejvýznamnějším přínosem zvýšení účinnosti kontroly dodržování nařízení (ES) č. 1169/2011 a nařízení (ES) č.178/2002 a potažmo snížení podílu falšovaných masných výrobků v tržní síti, včetně podniků veřejného stravování. Zde však finanční přínos nelze dostatečně přesně odhadnout.

7 SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

1. Ortea I, O'Connor G, Maquet A (2016) Review on proteomics for food authentication. *J Proteomics* 147:212–225 . doi: 10.1016/j.jprot.2016.06.033
2. Black C, Chevallier OP, Elliott CT (2016) The current and potential applications of Ambient Mass Spectrometry in detecting food fraud. *TrAC Trends Anal Chem* 82:268–278 . doi: 10.1016/j.trac.2016.06.005
3. Vaclavik L, Hrbek V, Cajka T, Rohlik B-A, Pipek P, Hajslova J (2011) Authentication of Animal Fats Using Direct Analysis in Real Time (DART) Ionization–Mass Spectrometry and Chemometric Tools. *J Agric Food Chem* 59:5919–5926 . doi: 10.1021/jf200734x
4. Takats Z, Denes J, Kinross J (2012) Identifying the margin: a new method to distinguish between cancerous and noncancerous tissue during surgery. *Future Oncol* 8:113–116 . doi: 10.2217/fon.11.151
5. Balog J, Perenyi D, Guallar-Hoyas C, Egri A, Pringle SD, Stead S, Chevallier OP, Elliott CT, Takats Z (2016) Identification of the Species of Origin for Meat Products by Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* 64:4793–4800 . doi: 10.1021/acs.jafc.6b01041
6. Black C, Chevallier OP, Haughey SA, Balog J, Stead S, Pringle SD, Riina MV, Martucci F, Acutis PL, Morris M, Nikolopoulos DS, Takats Z, Elliott CT (2017) A real time metabolomic profiling approach to detecting fish fraud using rapid evaporative ionisation mass spectrometry. *Metabolomics* 13: . doi: 10.1007/s11306-017-1291-y

8 SEZNAM PUBLIKACÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍCH METODICE

Vzhledem k novosti postupu využitého v této metodice nebyly zatím řešitelským pracovištěm Ústavu analýzy potravin a výživy publikovány na dané téma zde popsané postupy ani výsledky. Původní publikace výsledků v odborném časopise je v přípravě.

AUTOŘI A OPONENTI

Metodu zpracovali:

Ing. Vít Kosek, prof. Ing. Vladimír Kocourek, CSc., prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc.

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,

Ústav analýzy potravin a výživy, FPBT

Technická 3, 166 28 Praha 6 - Dejvice

Oponenti:

1) **Ing. Martin Kubík**, Inspektorát SZPI v Praze, NRL

Za Opravnou 300/6, 150 00 Praha – Motol

2) **Doc. Ing. Roman Kubec, Ph.D.**, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,

Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice

Autoři metodiky (procentuální podíl na vypracování metodiky):

Vít Kosek (45 %), Vladimír Kocourek (15 %), Jana Hajšlová (40 %)

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Metoda metabolického fingerprintingu pro autentikaci biologického původu masa

Vydala: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Technická 5, 166 28 Praha 6

Rok vydání: 2017

Počet stran: 21

Vydání: první



OVĚŘOVACÍ DOLOŽKA KONVERZE DOKUMENTU

Ověřuji pod pořadovým číslem 2017-9-1412-70782, že tento dokument označený v rámci organizace identifikátorem SZPI7102A7058, který vznikl převedením vstupu v elektronické podobě do podoby elektronické, skládající se z 21 listu(ů), se doslovně shoduje s obsahem vstupu.

Zajišťovací prvek:

Ověřující osoba:

Vystaveno dne:

Vystavil:

Původní dat. formát:

Mgr. Švomová Pavla
2017-12-18 12:41:51
SZPI, Podatelna ÚI
Květná 15, 603 00 Brno
pdf