



FUNKČNÍ VZOREK

**Souprava ke kontrole analýzy
problematických matric na přítomnost
neobalených virů jejichž genom je tvořen RNA**

**Mgr. Magdaléna Krásna
Mgr. Petra Vašíčková, Ph.D.
Mgr. František Hubatka
MVDr. Pavel Kulich, Ph.D.
Mgr. Radek Tesařík, Ph.D.**

**5633
2019**

Funkční vzorek 5633/2019

Souprava ke kontrole analýzy problematických matric na přítomnost neobalených virů jejichž genom je tvořen RNA

Autoři

Mgr. Magdaléna Krásna
Mgr. Petra Vašíčková, Ph.D.
Mgr. František Hubatka
MVDr. Pavel Kulich, Ph.D.
Mgr. Radek Tesařík, Ph.D.

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu TAČR GAMA TG03010038.

2019

ISBN 978-80-88233-78-7

Obsah

1. Úvod.....	3
2. Předmět funkčního vzorku	4
3. Vlastní popis metodiky funkčního vzorku	4
3.1. Příprava rekombinantních MS2 PLP	4
3.2. Kvantifikace a ověření kvality vyprodukovaných MS2 PLP	5
3.3. Kontrolní body při produkci MS2 PLP	6
3.4. Stanovení vhodných podmínek skladování MS2 PLP	8
3.5. Postup použití MS2 PLP při rutinní analýze vzorků	12
3.6. Vyhodnocení kvality postupu výroby MS2 PLP	13
4. Srovnání „novostí postupů“	13
5. Uplatnění funkčního vzorku	14
6. Ekonomické aspekty	14
7. Seznam použité literatury	15

1. Úvod

Virová agens jsou původci mnoha závažných onemocnění nejen člověka a zvířat. Metody jejich stanovení jsou založeny na přímém průkazu jejich proteinů či genomu (DNA/RNA). Významnou detekční metodou je kultivace na buněčných kulturách. Ta však bývá u celé řady virů problematická, v některých případech časově velmi náročná či nestandardizovaná, a tak nepoužitelná k rutinním analýzám. Diagnostika infekce může být také založena na nepřímém průkazu daných agens, na detekci protilátek vytvořených infikovaným organismem. Každá z těchto metod má své výhody a nevýhody. Správný postup stanovení a určení virových agens je nutno vztáhnout nejen k citlivosti, časové i finanční náročnosti dané metody, ale také zejména k analyzované matici. Vzhledem k těmto faktorům je jednou z nejpoužívanějších metod polymerázová řetězová reakce (PCR), která je plně využitelná u jakéhokoliv typu analyzované vzorku.

PCR reakci předchází krok izolace nukleových kyselin (DNA/RNA). U virů jejichž genom je tvořen RNA je před PCR nutno provést reverzní transkripci (RT). Objev PCR v reálném čase (qPCR) navíc umožňuje nejen detekci, ale také kvantifikaci virové nálože v různých typech matic. Neodpovídající výsledky této vysoce citlivé metody mohou být způsobeny kontaminacemi, inhibicí RT či/a PCR reakce nebo také selháním v předcházejícím, klíčovém kroku analýzy vzorku – izolaci nukleových kyselin. Proto by k zajištění validních výsledků měl být každý krok analýzy patřičně kontrolován. K tomuto účelu je využíván systém pozitivních a negativních kontrol. U virových agens, obzvláště těch jejichž genom je tvořen RNA, je častým problémem právě správná volba kontroly izolace nukleových kyselin.

Dle doporučení norem (ISO 15216-1:2017 a ISO 15216-2:2013), které jsou cíleny na problematické matrice jako je drobné ovoce, listová zelenina, mlži, stěry prostředí a voda, je k těmto účelům nejvhodnější použít tzv. process control virus (PCV), který se v definovaném množství před začátkem analýzy přidá ke každému jednomu vzorku a tak slouží jako kontrola průběhu jednotlivých kroků analýzy. Takovýto virus by neměl být patogenní pro člověka a zároveň by měl mít podobné fyzikálně-chemické vlastnosti, jako mají cílová patogenní agens. Zároveň by měl být na genetické úrovni dostatečně odlišný od cílových patogenů, aby mohl být v RT-qPCR specificky prokázán, a neměl by se v analyzovaných vzorcích přirozeně vyskytovat.

Mezi agens, která jsou zároveň nepatogenní pro člověka, jsou pro tyto účely nejčastěji používána a zároveň splňují další specifikace ISO norem patří mutantní kmen mengoviru (MC₀), felinní kalicivirus a murinní norovirus. Příprava dostatečného množství těchto virů probíhá kultivací na buněčných liniích. Jedná se o zdoluhavý proces, přičemž kultivace každého z virů musí mít zabezpečeny specifické podmínky. S tím je spojeno uzpůsobení laboratoře pro práci s buněčnými kulturami. Navíc při rutinním použití takto připravených kontrol byly zjištěny významné rozdíly mezi jednotlivými šaržemi.

Řešením výše uvedeného problému je založit kontrolu procesu analýzy vzorků na poměrně jednoduché variantě, MS2 fágům podobným částicím (MS2 PLP). MS2 PLP jsou *in vitro* připravené virové částice, do jejichž genomu je možné vložit jakoukoliv cílovou molekulu RNA (Pasloske 1998). Velkou výhodou je, že vložená RNA je obalena kapsidou, a tak chráněná před degradací vlivem všudypřítomných RNáz, ale zároveň je možné její uvolnění pro potřeby RT-qPCR. Příprava MS2 PLP probíhá v bakteriích *E. coli*, což je v porovnání s přípravou v buněčných kulturách efektivnější a rychlejší způsob výroby, který se dá kontrolovat v průběhu produkce prostřednictvím zavedených kontrolních bodů.

2. Předmět funkčního vzorku

Cílem funkčního vzorku bylo zavést a standardizovat sériovou výrobu MS2 PLP a připravit tak vhodný prostředek ke kontrole analýzy vzorků na přítomnost neobalených virových agens jejichž genom je tvořen RNA. Do postupu přípravy MS2 PLP byly zavedeny kontrolní body, které zaručí, že konečný produkt standardizované sériové výroby bude, nezávisle na konkrétní produkované šarži, vyráběn ve vysoké kvantitě a nebude obsahovat kontaminující proteiny či molekuly DNA. Zároveň byly definovány vhodné podmínky skladování tohoto prostředku.

3. Vlastní popis metodiky funkčního vzorku

3.1. Příprava rekombinantních MS2 PLP

Unikátní kontrolní sekvence (kombinace mitochondriální DNA vakovlka tasvánského, *Thylacinus cynocephalus*, GenBank accession No. FJ515781.1 a ptáka moa, *Dinornis struthoides*, GenBank accession No. AY326187.1) byla vložena do klonovacího místa 2

(MCS2) vektoru pACYCDuet-1 (do tohoto klonovacího místa je možné vložit jakoukoliv jinou cílovou molekulu DNA; PCR produkt). Do klonovacího místa 1 (MCS1) tohoto vektoru byl následně ligován PCR produkt amplifikovaný z *de novo* syntetizované sekvence nesoucí dimerizovaný coat protein a His-tag. Vzniklý plazmid byl transformován do buněk *E. coli* BL21 (DE3; Mikel et al., 2017); kontrolní bod 1.

Buňky *E. coli* BL21 (DE3) nesoucí rekombinantní plazmid byly kultivovány v LB médiu s přídavkem chloramfenikolu (výsledná koncentrace 34 µg/ml) při 37 °C/ 150 rpm na horizontální kruhové třepačce do optické denzity OD₆₀₀ = 1,7 a následně v TB médiu do OD₆₀₀=0,8 (přídavek chloramfenikolu - 34 µg/ml, inkubace při 37 °C/150 rpm). Exprese byla následně indukovaná IPTG (konečná koncentrace v roztoku 2 mM) a probíhala po dobu 16 hodin při 37 °C/150 rpm; kontrolní bod 2.

Tato kultura již s obsahem MS2 PLP byla centrifugována při 6700×g/15 min a k odebranému supernatantu byly přidány nukleázy: 200 U Turbo DNáza (Ambion, ThermoFisher Scientific), 2 500 U benzonáza (Sigma-Aldrich), 700 U RNáza A (Qiagen). Vzorek byl ultrasonikován a následně inkubován 37 °C/3 hod/200rpm; kontrolní bod 3.

Purifikace MS2 PLP byla provedena kapalinovou chromatografií (FPLC) za použití kolonky HiTrap TALON Crude (GE Healthcare) – kobalt chelatační chromatografie. Získaný roztok MS2 PLP byl odsolen pomocí kolonek s membránami Vivacon 10 kDa, MS2 PLP byly následně eluovány do STE (Sodium Chloride –Tris- EDTA) pufru (pH = 7,5); kontrolní bod 4.

3.2. Kvantifikace a ověření kvality vyprodukovaných MS2 PLP

Kvantifikace vyprodukovaných MS2 PLP byla prováděna RT-qPCR. Součástí tohoto systému je interní amplifikační kontrola a kvantifikační gradient ve formě RNA (Mikel et al., 2017); kontrolní bod 5.

Struktura částic byla ověřena elektronovou mikroskopií s použitím barvení 2% molybdenanem amonným; kontrolní bod 6.

Další metodou použitou k ověření kvality připravených MS2 PLP byl dynamický rozptyl světla (DLS) měřený na přístroji Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical). DLS určí hodnotu Z-Average (d.nm) tzv. hydrodynamický průměr měřených částic v nm. Klíčovou hodnotou je také

polydisperzita (Pdl), která charakterizuje uniformitu distribuce měřených částic; kontrolní bod 7.

3.3. Kontrolní body při produkci MS2 PLP

Kontrolní bod 1

Pomocí PCR reakcí s inzerčně (v tomto případě 1. kombinace mitochondriální DNA vakovlka tasvánského a ptáka moa a 2. sekvence nesoucí dimerizovaný coat protein a His-tag) a vektorově specifickými primery lze ověřit, zda tyto sekvence byly úspěšně vloženy do klonovacího vektoru a plazmid byl transformován do buněk *E. coli* BL21 (DE3). Přítomnost specifických inzertů v klonovacím vektoru lze také ověřit sekvenováním.

Výsledkem jsou PCR produkty o specifické velikosti a/nebo odpovídající sekvence nukleotidů.

Kontrolní bod 2

Po indukci exprese IPTG už nedochází k pomnožování buněk *E. coli* BL21 (DE3). Při špatné indukci exprese dochází k pokračování jejich růstu a vzniklá peleta po centrifugaci kultury inkubované po dobu 16 hodin při 37 °C/150 rpm s přidavkem IPTG je větší jako den před tím při OD₆₀₀=0,8.

Výsledkem je podobná velikost pelety kultury kultivované v TB médiu do OD₆₀₀=0,8 (přídavek chloramfenikolu - 34 µg/ml, inkubace při 37 °C/150 rpm) a kultury inkubované 16 hod/37 °C/150 rpm s přidavkem IPTG.

Kontrolní bod 3

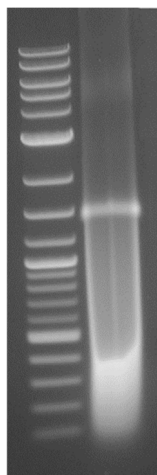
Po centrifugaci kultury s již pomnoženými MS2 PLP a přidání nukleáz se z roztoku odebere 20 µl. Přítomnost MS2 PLP je ověřena použitím elektroforézy, vizualizace genomu v 1% agarózovém gelu s přidavkem ethidium bromidu, Sodium/Borátový pufr.

Výsledkem je band o velikosti 1,5 kb (obrázek 1).

Kontrolní bod 4

Při purifikaci MS2 PLP (FPLC) elučním pufrém s obsahem 200 mM imidazolu v průběhu eluce z kolonky se tvoří charakteristický eluční „peak“.

Obrázek 1: Výsledek elektroforézy detekující přítomnost MS2 PLP po centrifugaci kultury (band o velikosti 1,5 kB).



Kontrolní bod 5

Kvantifikace vyprodukovaných MS2 PLP je prováděna RT-qPCR. Zároveň je sledována kontaminace připravených částic DNA; připravené částice jsou naředěny 1 000× a 10 000× a podrobeny RT-qPCR reakci do které není přidán enzym reverzní transkriptáza.

Výsledkem je standardní kvantita cca 1×10^{10} MS2 PLP genomových ekvivalentů/μl roztoku STE pufru.

Kontrolní bod 6

Struktura částic je ověřena elektronovou mikroskopií s použitím barvení 2% molybdenanem amonným.

Výsledkem jsou virové částice o specifické velikosti a neporušenou kapsidou, které jsou rovnoměrně rozptýleny v zorném poli mikroskopu (obrázek 2 a 3).

Kontrolní bod 7

Dynamický rozptyl světla (DLS). DLS určí hodnotu Z-Average (d.nm, tzv. hydrodynamický průměr měřených částic v nm) a polydisperzitu (PdI; charakteristika uniformity distribuce měřených částic).

Výsledkem je hodnota hydrodynamického průměr minimálně 33 nm a maximální hodnota polydisperzity u purifikovaného homogenního vzorku do 0,170 (obrázek 4).

3.4. Stanovení vhodných podmínek skladování MS2 PLP

Klíčovým faktorem při použití MS2 PLP jako kontroly procesu analýzy různých typů matic je také jejich dlouhodobé skladování. K tomuto účelu byly zvoleny tři druhy kryoprotektantů o různých koncentracích (tabulka 1). Jako kontrola celého experimentu byly použity MS2 PLP v roztoku STE s obsahem bovinního sérového albuminu (BSA; 50 µg/ml) bez obsahu kryoprotektantu. Vzorky (koncentrace MS2 PLP) s obsahem kryoprotektantů, včetně kontroly. Mrazení na -20 °C není doporučeno kvůli zvýšené inaktivaci MS2 PLP v porovnání s uskladněním na -80 °C (Olson et. al., 2004), proto byly jednotlivé roztoky s částicemi zamrazeny na -80 °C. Doba uskladnění byla stanovena na jeden, tři a šest měsíců. Po ukončení daného skladovacího období byly MS2 PLP rozmrazeny. Integrity částic byla ověřena pomocí elektronové mikroskopie, dynamického rozptylu světla a RT-qPCR. Zároveň byla sledována odolnost částic při opakovaném rozmrazení a zamrazení.

Tabulka 1: Druhy kryoprotektantů a jejich koncentrace použité při stanovení nejvhodnějších podmínek dlouhodobého skladování MS2 PLP.

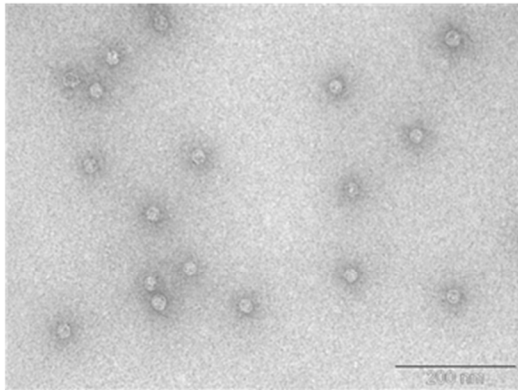
Kryoprotektant	Koncentrace 1	Koncentrace 2	Koncentrace 3
Dimethylsulfoxid (DMSO)	0,5 %	2 %	10 %
Sacharóza	10 %	20 %	30 %
Trehalóza	50 mM	200 mM	300 mM
Glycerol	10 %	20 %	-
Glycerol a sacharóza	10% glycerol v kombinaci se sacharózou (0,5 M)		

V případě vyšších koncentrací (koncentrace 2 a 3, tabulka 1) výše uvedených kryoprotektantů byla při skladování pozorována částečná deformace tvaru částic, a to už i po prvním měsíci experimentu. Zároveň docházelo k shlukování MS2 PLP do řetízkovitých útvarů a částečnému rozpadu. Ve všech koncentracích sacharózy byla na částicích pozorována souvislá vrstva této látky, nicméně vznik řetízkovitých struktur byl i tak zřetelný. Oproti tomu se při dlouhodobém skladování nejlépe osvědčily nízké koncentrace kryoprotektantů (koncentrace 1, tabulka 1). U všech výše uvedených roztoků kontrolní metody potvrdily požadovanou kvalitu částic i po dobu skladování tří měsíců a opakovaném rozmrazování (obrázek 2 a 3). Přesto nejvhodnějším kryoprotektantem k dlouhodobému skladování MS2 PLP po dobu 6 měsíců se ukázala být 300 mM trehalóza; struktura částic nejevila výrazné známky rozpadu nebo shlukování (obrázek 4).

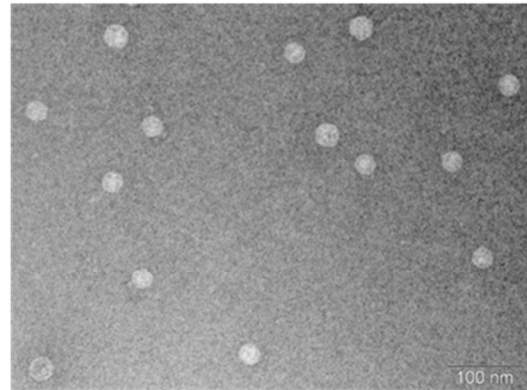
Negativní kontrola potvrdila nutnost použití kryoprotektantů k dlouhodobému uskladnění částic při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Výsledky získané analýzou negativní kontroly byly podobné jako u vzorků s obsahem vyššího procenta kryoprotektantů. V tomto případě sice nedocházelo ke shlukování částic do řetízkových útvarů, ale byl pozorován jejich rozpad. Během experimentu bylo také zjištěno, že MS2 PLP jsou stabilní i po půlročním skladování při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, což bylo ověřeno na základě porovnání hodnot Z-avg a PDI po měření dynamického rozptylu světla krátce po vyprodukování částic a po šesti měsících skladování při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (obrázek 5 a 6).

Obrázek 2: Fotografie elektronové mikroskopie MS2 PLP zamrazených po dobu jednoho měsíce při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ s různými kryoprotektanty. **A** 0,5% DMSO; **B** 10% Glycerol; **C** 10% Glycerol a 0,5 M Sacharóza; **D** STE a BSA ($50\text{ }\mu\text{g/ml}$); **E** 50 mM Trehalóza; **F** 2% DMSO.

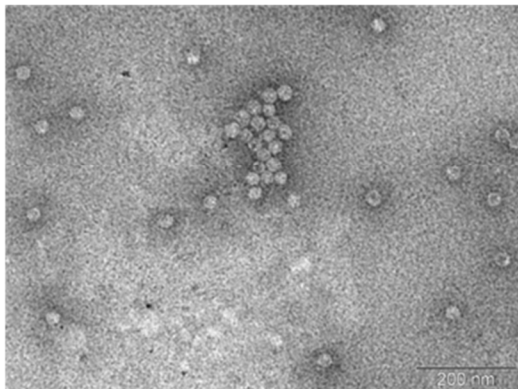
A



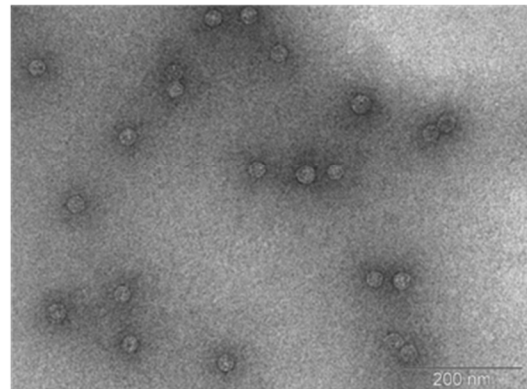
B



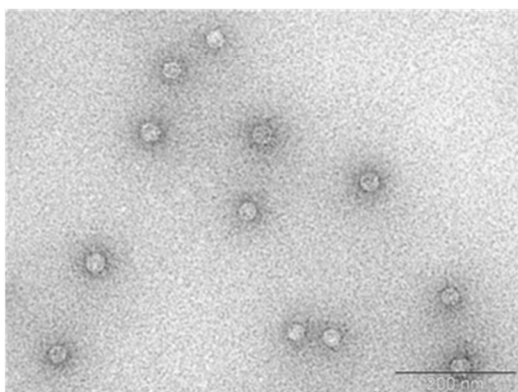
C



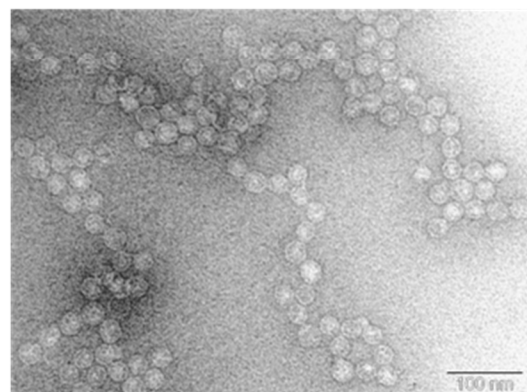
D



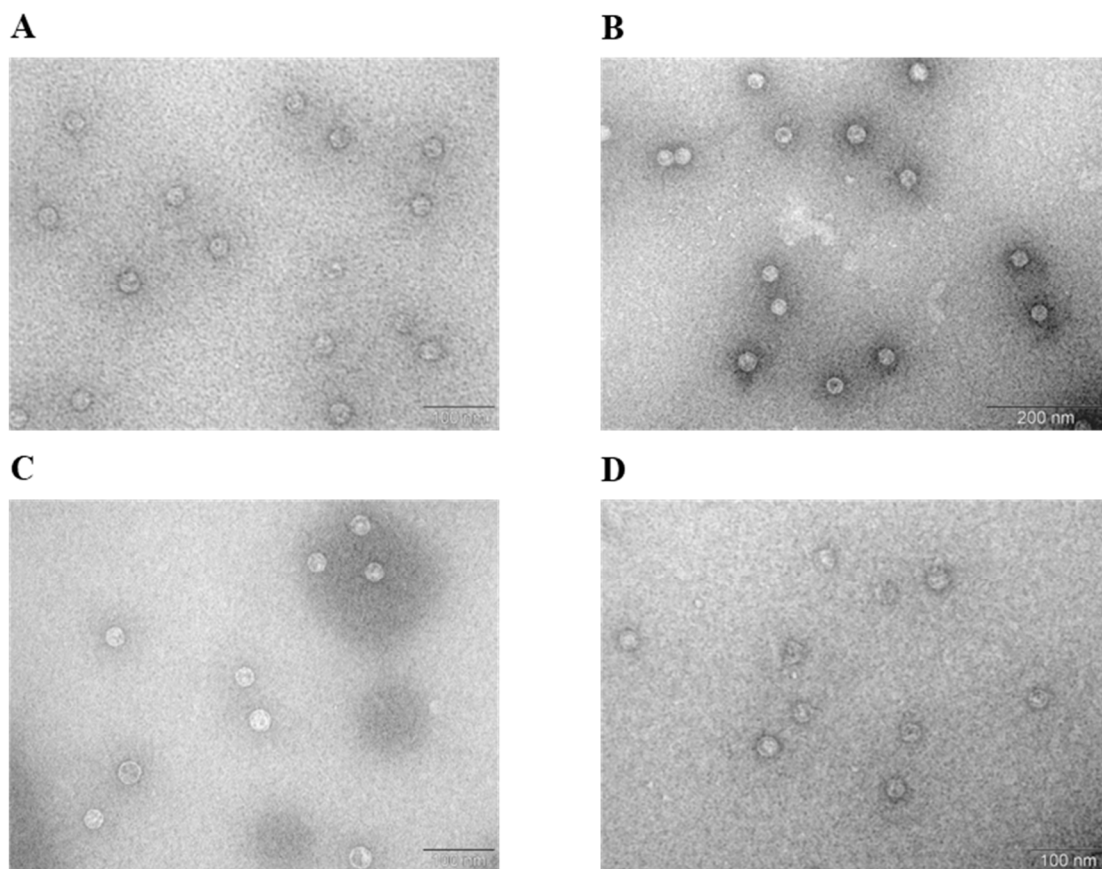
E



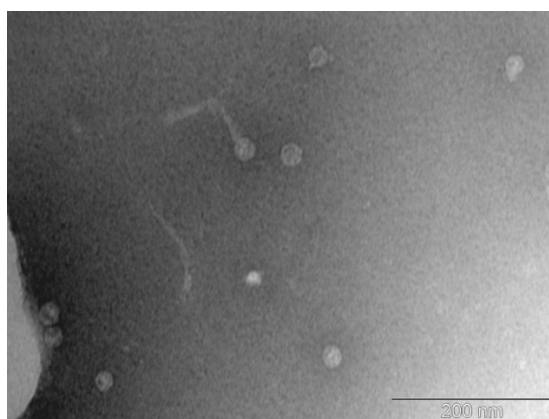
F



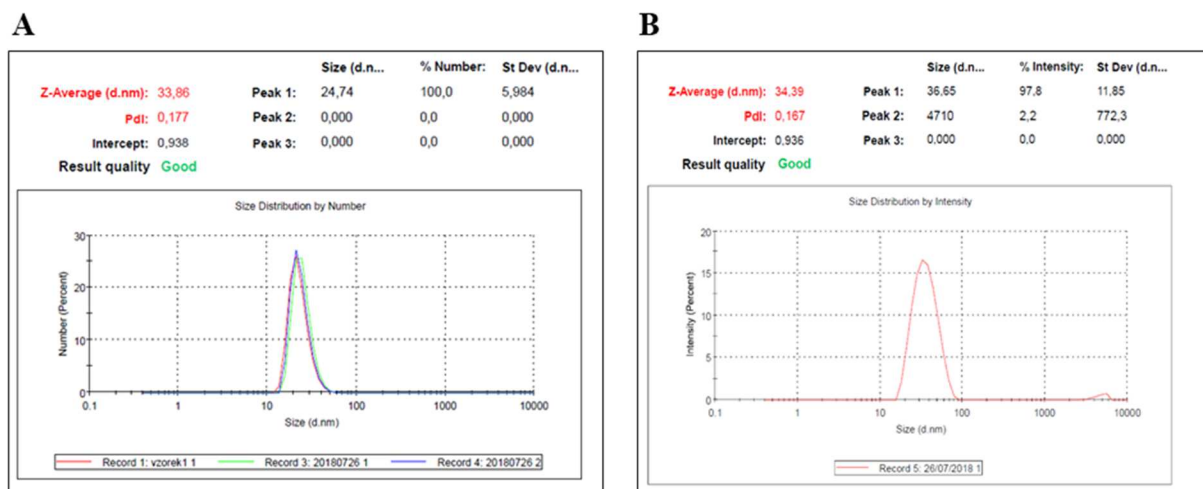
Obrázek 3: Fotografie elektronové mikroskopie MS2 PLP zamrazených po dobu tří měsíců při teplotě -80 °C s různými kryoprotektanty. **A** 0,5% DMSO; **B** 10% Glycerol; **C** 50 mM Trehalóza; **D** STE a BSA (50 µg/ml).



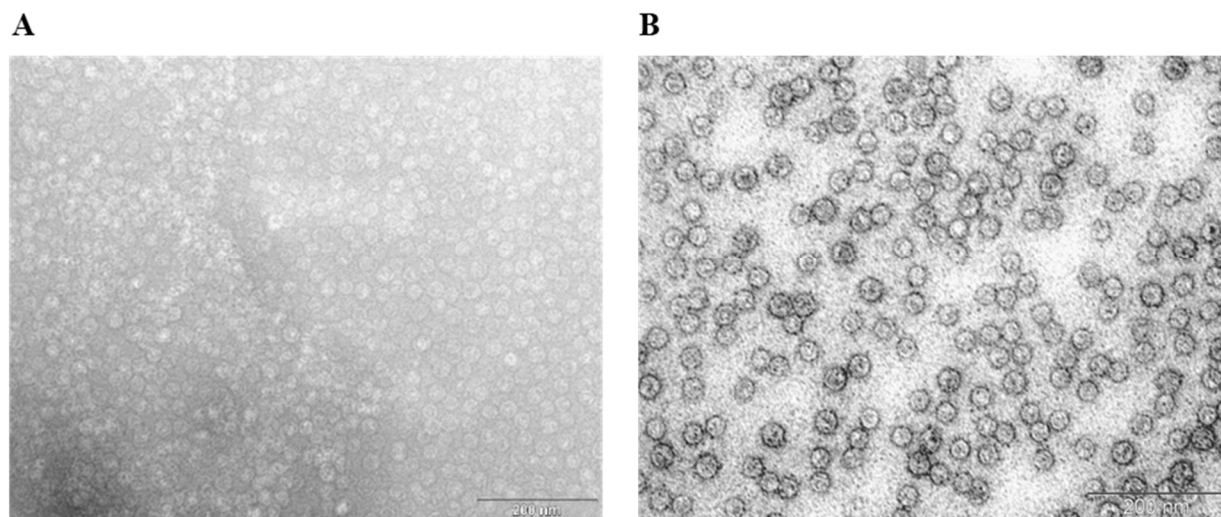
Obrázek 4: Fotografie elektronové mikroskopie MS2 PLP zamrazených po dobu šest měsíců při teplotě -80 °C s 300 mM Trehalózou.



Obrázek 5: Porovnání výsledků měření dynamického rozptylu světla MS2 PLP krátce po produkci (A) a po 6 měsících skladování při 4 °C (B).



Obrázek 6: Porovnání fotografií elektronové mikroskopie MS2 PLP krátce po produkci (A) a po 6 měsících skladování při 4 °C (B).



3.5. Postup použití MS2 PLP při rutinní analýze vzorků

Z dodaného roztoku MS2 PLP o koncentraci 1×10^6 genomových ekvivalentů/μl je doporučeno k dané navážce každého jednoho vzorku přidat 5 μl a následně provést izolaci nukleových kyselin dle vhodného metodického postupu. Množství vzorku je stanoveno dle požadavku použité metody izolace. Doporučené množství částic přidaných ke vzorkům vychází z postupů daných ISO 15216-1:2017. Vzorky je vhodné bez kroku zamrazení ihned analyzovat na přítomnost neobalených virů jejichž genom je tvořen RNA a provést kvantifikaci MS2 PLP, které prošly celým postupem analýzy dle Mikel et. al. 2015.

Stanovení množství MS2 PLP je v reakci RT-qPCR prováděno metodou absolutní kvantifikace a na základě kalibrační křivky. Množství MS2 PLP v každém jednom vzorku lze stanovit dle následujícího vzorce:

$$\text{MS2 PLP} = (x / 5) \times y$$

x - počet kopií cíle v reakci (stanoveno RT-qPCR)

y - množství, do kterého je eluována izolovaná nukleová kyselina (udáváno v μl)

Stanovení účinnosti celého (kompletního) postupu analýzy každého jednoho vzorku lze provést přepočtem podle následujícího vzorce:

$$\text{účinnost izolace (\%)} = \text{MS2 PLP} / 5 \times 10^6 * \times 100$$

* množství částic aRNA, které bylo uměle dodáno ke každému vzorku

Pokud se účinnost izolace pohybuje pod hodnotou 1 %, je doporučeno vzorek izolované RNA 5 $\times$ a 10 $\times$ naředit. Pokud tento postup nepomůže (hodnota účinnosti se po přepočtu stále pohybuje pod hodnotou 1 %), je nutno zopakovat izolaci RNA ze zásobního duplikátu daného vzorku.

Množství genomových ekvivalentů RNA viru (virová nálož) v 1 g nebo 1 ml vzorku lze stanovit dle následujícího vzorce:

$$\text{virová nálož} = ((x / 5) \times y / z) \times (100 / \text{účinnost izolace MS2 PLP}^*)$$

x - počet kopií cíle v reakci (stanoveno qRT-PCR)

y - množství, do kterého je eluována izolovaná nukleová kyselina (udáváno v μl)

z - množství použitého vzorku pro analýzu (g nebo ml)

* - hodnota účinnosti analytického postupu v %

3.6. Vyhodnocení kvality postupu výroby MS2 PLP

Díky optimalizaci kroků produkce MS2 PLP exprimovaným v bakteriích *E. coli* se podařilo zavést standardizovaný postup s reprodukovatelnými výsledky. Pomocí jednotlivých kontrolních bodů je možné monitorovat celý průběh produkce MS2 PLP tak, aby byla zaručena dostatečná kvantita a kvalita částic nezávisle na jednotlivých šaržích. Zároveň byly stanoveny podmínky uskladnění a podmínky reálného použití MS2 PLP v rutinní diagnostice.

4. Srovnání „novostí postupů“

Kontrola celého analytického postupu u klinických vzorků je pouze doporučena, v případě sledování významných zástupců virů způsobujících alimentární onemocnění (noroviry a virus hepatitidy A) je v potravinových matricích a prostředí stanovena ISO 15216-1:2017. Vzhledem

k vysoké náchylnosti RNA k degradaci, ke které může dojít při nevhodném zacházení se vzorkem již během jeho navážení, je takováto kontrola více než vhodná. K tomuto účelu je možné použít MS2 PLP. Ačkoli je praktické využití těchto částic v rutinní diagnostice poměrně neobvyklé, kontrola analýzy každého jednoho vzorku umožňuje spolehlivou identifikaci a kvantifikaci množství cílových (patogenních) neobalených virů jejichž genom je tvořen RNA ve vyšetřovaném vzorku. Současně umožňuje vyloučit falešně negativní výsledek a určit, ve kterém kroku analýzy vzorku došlo k selhání. Ve spojitosti s doporučovanou metodou izolace RNA je takto zaveden komplexní přístup k detekci a přesnější kvantifikaci patogenních neobalených virů jejichž genom je tvořen RNA v rozličných typech matric.

Funkční vzorek vychází z postupu přípravy MS2 PLP částic pro výzkumné účely a jeho novost spočívá ve spojení s výše uvedenými body ve standardizaci sériové výroby MS2 PLP pro potřeby rutinní diagnostiky, stanovení stability výsledných částic a v zavedení kontrolních bodů postupu přípravy MS2 PLP sloužících k ověření kvality výsledného produktu.

5. Uplatnění funkčního vzorku

Technologie přípravy MS2 PLP představuje možnost kontroly celého procesu průkazu neobalených RNA virů a odhalit tak chyby vzniklé při jednotlivých krocích, od samotné izolace nukleových kyselin až po kvantifikaci pomocí RT-qPCR. Uvedený koncept MS2 PLP usnadňuje využití částic pro veterinární a humánní praxi i výzkum a umožňuje validní analýzu jednotlivých vzorků.

6. Ekonomické aspekty

Použití MS2 PLP je na pracovišti autorů plně zavedeno a používáno při rutinní diagnostice i při experimentální vývoji metod. Vzhledem k tomu že do MS2 PLP lze vložit jakoukoli cílovou sekvenci a připravit tak MS2 PLP přímo dle požadavků zákazníka standardizované šarže MS2 PLP je možno tento produkt nabídnout také biotechnologickým firmám.

Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu TAČR GAMA TG03010038.

7. Seznam použité literatury

- ISO 152 16 – 1 (2017) Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR – Part 1: Method for quantification, 1st Edn. Geneva: International Organization for Standardization.
- Pasloske, B.L., Walkerpeach, C.R., Obermoeller, R.D., Winkler, M., DuBois, D.B. (1998). Armored RNA technology for production of ribonuclease resistant viral RNA controls and standards. *J. Clin.Microbiol.* 36, 3590–3594.
- Mikel, P., Vasickova, P., and Kralik, P. (2015). Methods for preparation of MS2 phage-like particles and their utilization as process control viruses in RT-PCR and qRT-PCR detection of RNA viruses from food matrices and clinical specimens. *Food Environ. Virol.* 7, 96–111. doi: 10.1007/s12560-015- 9188-2
- Olson, M.R., Axler, R.P., Hicks, R.E. (2004) Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. *J.Virol. Methods.* 122, 147-152.
- Mikel, P., Vasickova, P., Kralik, P. (2017) One-plasmid double-expression His-tag system for rapid production and easy purification of MS2 phage-like particles. *Scie. Reports.* 7. 17501.



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz