



FUNKČNÍ VZOREK

Imunodifúzní test pro stanovení imunoglobulinů v kravském kolostru

**MVDr. Josef Krejčí
Hana Kudláčková
Mgr. Radek Tesařík, Ph.D.
Mgr. Jan Gebauer, Ph.D.
MVDr. Martin Faldyna, Ph.D.
MVDr. Soňa Šlosárková, Ph.D.**

**4339
2016**

Funkční vzorek

4339/2016

Imunodifúzní test pro stanovení imunoglobulinů v kravském kolostru

Autoři

MVDr. Josef Krejčí

Hana Kudláčková

Mgr. Radek Tesařík, Ph.D.

Mgr. Jan Gebauer

MVDr. Martin Faldyna, Ph.D.

MVDr. Soňa Šlosárková, Ph.D.

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu **QJ1510219**, projektu Rozvoj výzkumné organizace RO0516 a projektu LO1218 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR v rámci programu NPU-I.

ISBN 978-80-86895-92-5

2016

OBSAH

Úvod	4
I. Cíl metodiky	5
II. Vlastní popis metodiky	6
II.1. Postup izolace a purifikace bovinního IgG	6
II.2. Příprava králíčího antiséra proti bovinnímu IgG	7
II.3. Provedení vlastního testu radiální imunodifúze (RID)	8
II. 4. Vyhodnocení RID testu	10
III. Porovnání testu radiální imunodifúze s jinými metodami	
použitelnými k měření obsahu imunoglobulinů v mléčných sekretech	12
IV. Srovnání novosti postupu	14
V. Uplatnění funkčního vzorku	14
VI. Ekonomické aspekty	15
VII. Patentová ochrana	15
VIII. Seznam citované literatury	15
Dedikace	16

Úvod

Význam specifických protilátek obsažených v kolostru savců je znám již dlouho. Tyto protilátky chrání novorozená zvířata proti septickým onemocněním mají zvláštní význam pro mláďata kopytnatců, která se rodí bez mateřských protilátek a jsou proto zcela odkázána na protilátky získané z kolostra. Právě nedostatečný přísun specifických mateřských protilátek kolostrem je jednou z hlavních příčin zvýšené nemocnosti, případně až úhynů novorozených telat. A to nejen v důsledku septických onemocnění, ale i respiračních. Část kolostrálních protilátek vstřebaných do krve novorozených telat totiž proniká již v prvních hodinách po narození na povrch sliznice respiračního traktu, na níž, po dobu několika dnů, zajišťují její ochranu proti infekcím.

Ochrana proti novorozeneckým infekcím telat je proto zcela závislá na množství, případně kvalitě přijatého kolostra. Případy, kdy se přenos specifické imunity z matky na mláďe neuskuteční buď vůbec, nebo jen v omezené míře, jsou v podmínkách moderních chovů poměrně časté. Na tomto stavu se kromě chovatelských chyb podílí i skutečnost, že napájené kolostrum má kolísavou kvalitu, zejména pokud se týče obsahu imunoglobulinů.

Uvedené skutečnosti jsou proto důvodem k tomu, že chovatelé mají zájem ověřovat kvalitu podávaného kolostra a v případech jeho nedostatečnosti ho doplňovat různými doplňky. Pro potřebu samotných chovatelů byla vyvinuta řada rychlých a jednoduchých metod, které jsou schopny orientačně odlišit kolostra různé kvality. Většina těchto metod stanovuje orientačně celkový obsah proteinů. Vychází z předpokladu, že zatímco obsah neimunoglobulinových proteinů v kolostru je přibližně konstantní, obsah imunoglobulinů kolísá. Proto kolísání obsahu celkových bílkovin v mléčných sekretech je podmíněno právě kolísáním jejich imunoglobulinové frakce. Metody, které jsou k tomuto účelu používány, jsou založeny na následujících principech:

- stanovení hustoty pomocí hustoměrů (kolostroměrů) vychází z poznatku, že hustota kolostra je přímo úměrná obsahu proteinu (Fleenor a Stott, 1980),
- refraktometricky - na základě indexu lomu světla roztoku; úhel lomu světla je úměrný koncentraci bílkovin v něm obsažených. K tomuto účelu bývají používány refraktometry používané v cukrovarnictví, případně refraktometry konstruované

přímo pro testování kvality kolostra (Molla, 1980; Moor aj., 2009; Biemann aj., 2010),

- na základě barvy kolostra měřeného technikou využívající barevný prostor LAB (Gross aj. 2014).

S výjimkou posledně jmenované, jsou uvedené metody v chovatelské praxi hojně používány a dostatečně prokázaly svoji užitečnost. Jejich společnou nevýhodou je skutečnost, že jsou pouze orientační a dovolují jen hrubé rozlišení kvality zkoumaného kolostra. Obvykle dělí kolostra na vyhovující (obsah imunoglobulinů nad 50g/litr) a nevyhovující, případně vynikající (výrazně převyšující uvedenou limitní hodnotu).

V některých případech je však nutné přesnější stanovení imunoglobulinů; týká se to zejména případů, kdy máme srovnávat kvantitativní obsahy imunoglobulinů v různých kolostrech, případně sledovat jejich dynamiku v průběhu tranzitního období a v některých experimentech, případně v potravinářských sledováních. Pro všechna tato sledování je nutná přesnější metoda, která by přímo stanovovala reálnou koncentraci imunoglobulinů.

Možností stanovit skutečný obsah imunoglobulinů v kolostru nebo mléce není mnoho. Nabízí se jejich stanovení ELISA metodou, nicméně její použití je omezeno právě její největší výhodou, tj. nadměrnou citlivostí. Vzhledem k poměrně vysoké koncentraci imunoglobulinů v mlezivu je nutné, aby bylo možno dosáhnout detekční oblasti, testované vzorky velmi ředit; i malé manipulační chyby se tímto způsobem enormně zvětšují. Takto dosažené výsledky jsou pak nereálné a málo diferencované. Z uvedených důvodů se proto ELISA metoda příliš často nepoužívá. Na její malou spolehlivost relativně nedávno upozornili Gelsinger aj. (2015).

Ze starších metod v úvahu nepřichází ani jinak často používaná metoda srážení síranem zinečnatým. Tato metoda se osvědčila jako relativně spolehlivá pro stanovení imunoglobulinů v krevních sérech telat; pro kolostra není použitelná s ohledem na její citlivost k měnícímu se pH roztoku. Velké výkyvy pH mléčných sekretů proto znemožňují její použití. Naopak by snad mohla být použita velmi klasická metoda vysolování síranem amonným, kdy při jeho určitých koncentracích v roztoku vypadávají jednotlivé frakce krevního séra. Tato metoda bude proto rovněž zahrnuta v níže uvedeném porovnání různých použitelných metod.

Další dvě metody, které přicházejí v úvahu, patří již mezi klasické. Jsou to: elektroforéza v různých modifikacích a metoda radiální imunodifúze (RID). Prvně jmenovaná se ke stanovování obsahu imunoglobulinů v mléčných sekretech používá jen velmi zřídka. Nikoliv pro případnou nepřesnost, ale zejména pro její pracnost, zdlouhavost a pro nutnost použít speciální aparaturu, která je v našich laboratořích stále méně používána. Proti tomu metoda radiální imunodifúze, a to i vzdor své letitosti (Mancini aj., 1965 a Fahey aj., 1965), je stále často používaná a dokonce si vysloužila označení „zlatého standardu“; zejména pak v případech stanovení imunoglobulinů v krevních sérech. Pokud se týče jejich stanovení v mléčných sekretech, její použití naráží na stejný problém jako v případě ELISA metody a tím je nutnost testované vzorky nejdříve naředit a tím zvětšovat nevyhnutelnou laboratorní chybu. Naštěstí, nutné ředění testovaných koloster je o několik řádů nižší než v případě výše vzpomínané ELISA metody.

Z uvedeného přehledu vyplývá, že pouze metoda radiální imunodifúze, byť s výhradami, splňuje požadavky na metodu vhodnou pro kvantitativní stanovení imunoglobulinů v mléčných sekretech. Tato metoda byla k tomuto účelu použita v minulosti již několikrát, nicméně, nejedná se o rutinní metodu, pro niž by existovaly komerční dostupné soupravy. Zájemci, kteří by ji chtěli použít, musí si pro ni připravit specifické antisérum, jehož příprava vyžaduje jisté dovednosti a zkušenosti. Samotná antiséra jsou sice komerčně dostupná (např. od firmy Bethyl, USA; případně i jiné firmy), jsou však vzhledem k prodávanému objemu nesmírně drahá. Proto je v našich podmínkách používána jen zřídka.

I. Cíl metodiky

Cílem následující metodiky je popis metody kvantitativního stanovení obsahu imunoglobulinů v kolostru a mléce krav metodou radiální imunodifúze. Popis metody nezahrnuje jen její provedení a vyhodnocení, ale i postupy přípravy nezbytných ingrediencí, tj. zejména specifického antiséra proti bovinnímu IgG.

II. Vlastní popis metodiky

II.1. Postup izolace a purifikace bovinního IgG

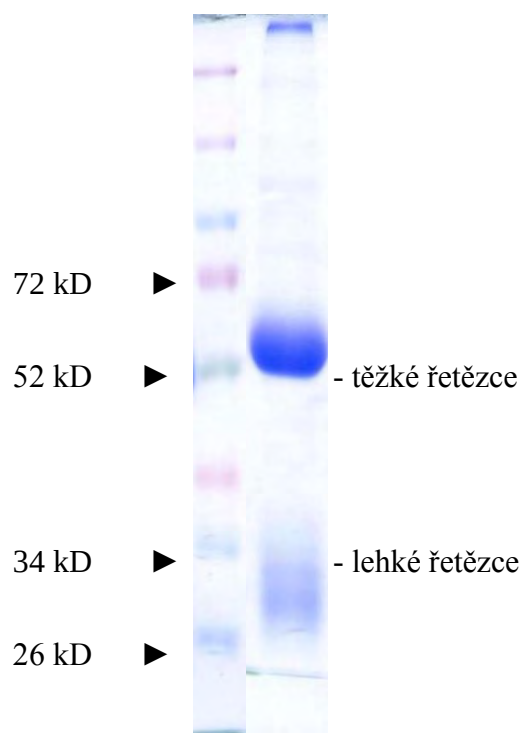
Kravské kolostrum z prvního nádoje se odstředí. Odstraní se horní vrstva tuku a sedimentované buňky. Kolostrum zbavené tuku a pevných součástí se sráží renninem (Rennin from calf stomach, Sigma; ≥ 20 unit). 1mg renninu rozpuštěného v PBS se přidává k 100 ml kolostra. Kolostrum se ponechá jednu hodinu srážet ve vodní lázni při 37⁰ C. Sraženina se poté odstraní centrifugací. Dále se zpracovává čistá syrovátka.

Gamaglobulinová frakce se vysráží síranem amonným. Nejprve při 40% a potom při 33% nasycením roztoku. Sraženina vzniklá v 33% roztoku síranu amonného se od roztoku oddělí další centrifugací. Dále se pracuje s touto sraženinou. Sraženina se rozpustí v PBS a znovu odstředí (10 000g) k odstranění případných nerozpustných sraženin.

Získaný roztok obsahující převahu IgG se zbaví síranu amonného pomocí odsolovací kolonky (PD-10, Sephadex G-25 GE Healthcare, UK) a je převeden do 20mM fosfátového pufru, pH7.4.

Dalším purifikačním krokem je afinitní chromatografie na FPLC chromatografu (Pharmacia) na proteinu G (kolona - HiTrap Protein G HP GE Healthcare, UK; ekvilibrována 20mM fosfátovým pufrem, pH7.4). Po nanesení vzorku a promytí pomocí ekvilibračního pufru, zachycená IgG frakce je z kolony eluována pomocí 0.1M glycinu, pH 2.7 a následně neutralizován na pH 7.4 pomocí 1M Tris, pH 9. Následnou dialýzou (Servapor dialysis tubing MWCO 12 000-14 000 RC, diameter 16mm) je IgG frakce převedena do PBS (výsledná čistota je asi 95%).

Koncentrace IgG v izolované frakci se stanoví soupravou pro stanovení bílkovin (Pierce BCA protein Assay Kit) a čistota purifikace se kontroluje pomocí SDS-PAGE (obr. 1).



Obr. č. 1 Výsledek izolace a purifikace bovinního IgG - kontrola čistoty na SDS-PAGE (redukční prostředí SDS rozděljuje molekulu IgG na těžké a lehké řetězce)

II.2. Příprava králíčího antiséra proti bovinnímu IgG

Králíci jsou imunizováni následujícím způsobem:

imunizační dávka pro všechny imunizace je 1mg IgG na kus.

- pro první imunizaci je tato dávka antigenu aplikována spolu s kompletním Freundovým adjuvans v poměru 1:1, intradermálně na několik míst.
- druhá imunizace se uskuteční po čtyřech týdnech; druhá dávka antigenu je stejná, jako adjuvans se použije inkompletní Freundovo adjuvans; vakcína je aplikována subkutánně.
- další dávka, stejné koncentrace antigenu a stejného složení jako předchozí je aplikována po dalších čtyřech týdnech, opět subkutánně.

Po dalších dvou týdnech je králíkům odebrána krev pro kontrolní vyšetření. Pokud je jejich protilátková odpověď dobrá (testováno dvojitou protisměrnou difúzí – Ouchterlony), mohou

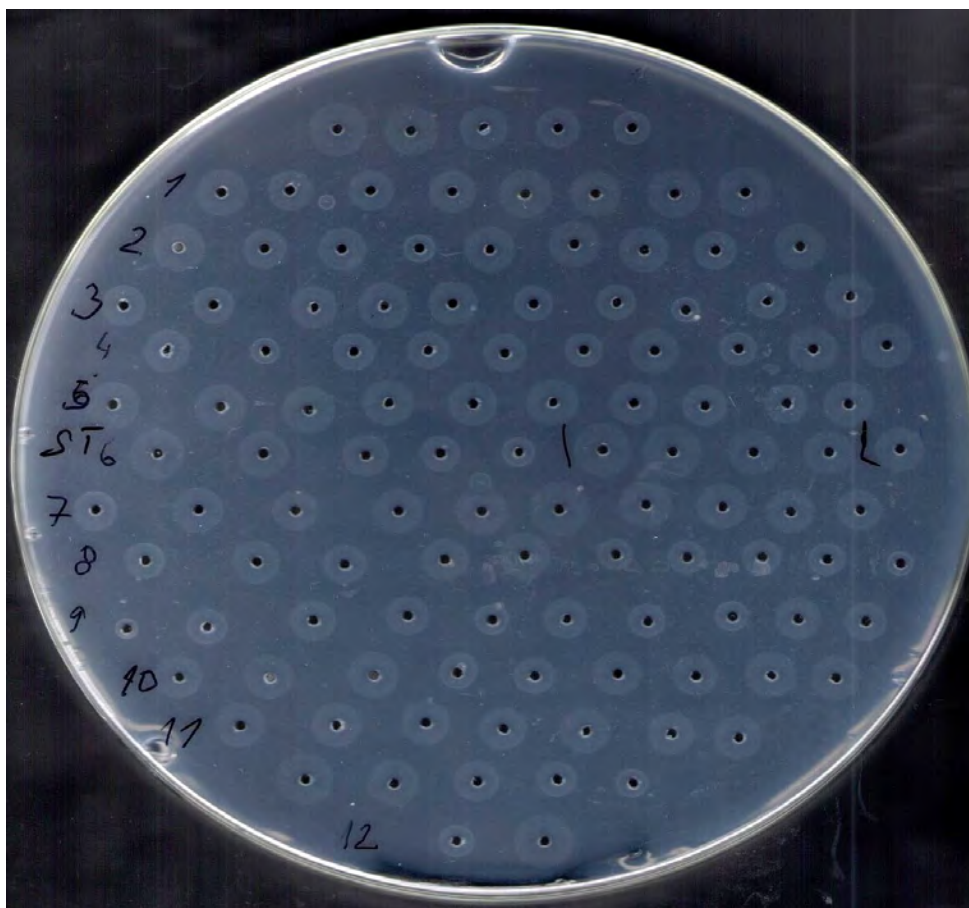
být buď vykrveni, nebo opakovaně odebírání s tím, že po dalších čtyřech až pěti týdnech jsou znovu imunizováni.

II.3. Provedení vlastního testu radiální imunodifúze

Princip: V agarózovém gelu obsahujícím protilátky proti bovinímu IgG (králíčí antisérum proti bovinímu IgG – příprava viz výše) se z předem připravené jamky nechá difundovat testovaný vzorek boviní kolostrální syrovátky. IgG obsažené v kolostru difunduje radiálně do všech stran tak dlouho, dokud se specifickými protilátkami antiséra v gelu nevytvoří precipitační linie. Tyto linie vznikají v místech ekvivalence antigen (IgG kolostra)/protilátka (antisérum proti bovinímu IgG). Precipitační linie má tvar kružnice, jejímž středem je jamka, do níž byl umístěn vzorek testovaného kolostra. Průměr kružnice je úměrný koncentraci imunoglobulinů.

Vlastní provedení testu RID: 1,5 % suspenze agarózy pro imunodifúzi v PBS (pH 7,2) se rozvaří ve vroucí vodní lázni. Potom se v jiné vodní lázni rozpuštěná agaróza nechá vytemperovat na 56⁰C a přidá se k ní antisérum rovněž vytemperované na přibližně 37⁰C a důkladně se ve vodní lázni promíchá. Poměr antiséra k agaru je nutno pro každou šarži antiséra vyzkoušet. Poměr by se neměl příliš odchylovat od poměru devět dílů agarózy k jednomu dílu antiséra. Pokud antisérum obsahuje příliš mnoho protilátek, je nutné je přiměřeně ředit, aby výše uvedený poměr zůstal zachován.

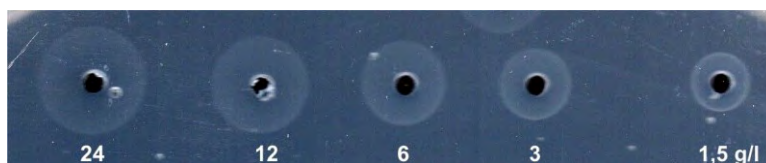
Směs agarózy a antiséra se naleje na vhodnou misku (skleněná Petriho miska různého poloměru podle množství vzorků, nebo polystyrenové víčko od mikrotitrační destičky apod.) (obr. č. 2).



Obr. č. 2 Agarózová vrstva nalitá do skleněné Petriho misky (200 mm).

Množství agarózy nalité na 1 cm^2 by mělo být 0,2 ml. Při nalévání je nutné, aby miska nebyla příliš studená (před vlastním nalitím je vhodné misky nechat vytemperovat v termostatu) a zejména je nutné, aby se misky nacházely v absolutně vodorovné poloze (desku, na níž se agaróza nalévá, je nutno vyrovnat pomocí vodováhy). Agaróza se potom nechá vychladnout a ztuhnout. Do agarózové vrstvy se pomocí duté jehly vykrájí jamky o průměru přibližně 2,5 mm. Vzdálenost jamek závisí na testovaných vzorcích; na jejich počtu a na očekávané koncentraci IgG v testovaných vzorcích.

Testované vzorky (syrovátka, nebo celé kolostrum) se do jamek nanášejí mikropipetou v objemu $5\mu\text{l}$ (objem musí být vždy stejný). Vlastní reakce mezi antigenem a antisérem probíhá buď při pokojové teplotě 24 hodin, nebo v chladničce 48 hodin. Současně s testovanými vzorky je nutné na každou misku umístit jedno, nebo i více standardních sér o známém obsahu IgG v několika ředěních (obr. č. 3).

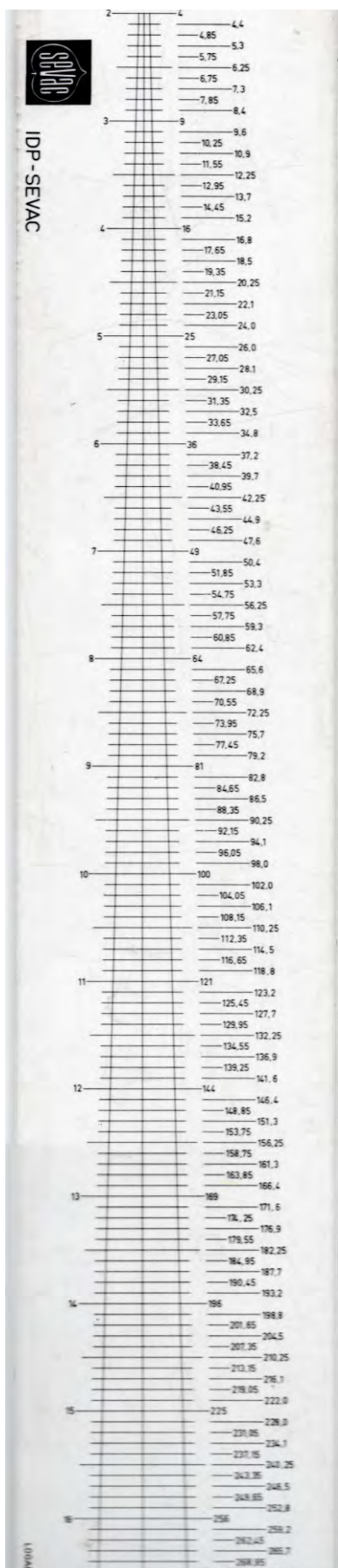


Obr. č. 3 Ředění standardního séra. Uvedená čísla odpovídají koncentracím IgG.

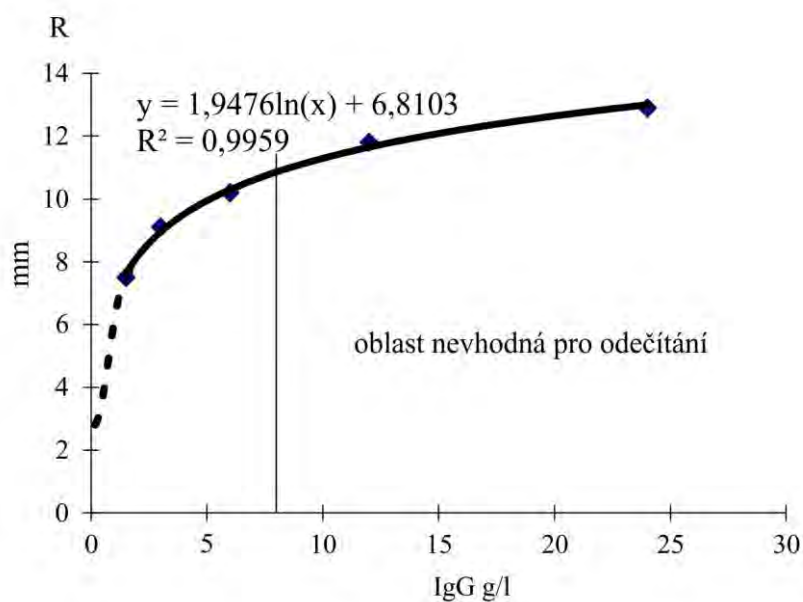
II. 4. Vyhodnocení RID testu

Po ukončení inkubace se odečítají průměry precipitačních kroužků, a to tak, že každý kroužek se změří dvakrát, vždy ve dvou na sebe kolmých směrech. Z obou měření se vypočítá průměr. Měření lze uskutečnit buď milimetrovým měřítkem, nebo speciálním měřítkem (obr. č. 4), které však, pokud je nám známo, není momentálně na trhu. Lze si ho však podle přiloženého obrázku zhotovit. Použití měřítka dává přesnější výsledky zatížené menší chybou.

Současně je nutné změřit i prstence vzniklé kolem různých ředění standardního séra a z výsledků udělat kalibrační křivku. Výsledná kalibrační křivka obvykle není lineární; její tvar se spíše blíží křivce logaritmické. Znamená to tedy, že čím je ve vzorku obsaženo více IgG, tím je kroužek sice větší, avšak vzhledem ke standardnímu séru se nachází v ploché části kalibrační křivky; vzájemné rozdíly v koncentracích IgG mezi vzorky, jejichž hodnoty IgG se nacházejí v této oblasti, jsou jen nepatrné. Proto je nutné nanášené vzorky ředit podle očekávané koncentrace imunoglobulinů. V případě jejich stanovení v kolostru je ředíme desetkrát. Pokud chceme dosáhnout spolehlivých výsledků, doporučujeme vzorky nanášet ve dvou ředěních. Jako konečný výsledek použijeme ten, jehož naměřený průměr se nachází ve vzestupné oblasti kalibrační křivky (obr. č. 5).



Obr. č. 4 Měřítko pro odečítání průměrů precipitačních prstenců



Obr. č. 5 Kalibrační křivka sestavena podle ředění standardního séra vyznačující oblast vhodnou pro odečítání precipitačních prstenců

III. Porovnání testu radiální imunodifúze s jinými metodami použitelnými k měření obsahu imunoglobulinů v mléčných sekretech.

V následující kapitole srovnáváme metody nejčastěji používané k hodnocení kvality kolostra, tj. obsahu imunoglobulinů. Popsanou RID metodu srovnáváme s výsledky dosaženými refraktometricky a pomocí vysolování.

Porovnání bylo uskutečněno na 29 vzorcích kolostra získaných v jednom chovu. Kolostra byla vysrážena renninem, výše popsaným postupem. Odstředěním získaná syrovátka byla vyšetřena těmito metodami:

- RID testem; k jeho vyhodnocení jsme použili standardní sérum firmy Bethyl. Výsledné hodnoty obsahu imunoglobulinů v kolostru jsme vypočetli podle dvou deklarovaných hodnot standardního séra: IgG1 a celkového IgG.
- Refraktometricky s pomocí Brixova refraktometru (naměřené hodnoty v % Brix jsou přepočítány na g/l IgG podle Bielmanna (2010)). Refraktometrické stanovení IgG bylo uskutečněno jak v syrovátce, tak i v celém kolostru.
- Vysolováním síranem amonným (Huergův roztok - 33% nasyceného roztoku síranu amonného).

Výsledky srovnání, včetně korelací, jsou shrnuty v tabulce (tab. č. 1) a vyneseny do grafu (graf č. 1).

Tab. č. 1 Srovnání výsledků stanovení koncentrací IgG v kolostrech, dosažených použitím různých metod (vzorky jsou seřazeny podle koncentrací IgG naměřených metodou RID s použitím standardu IgG1). Korelace mezi výsledky jednotlivých metod jsou uvedeny pod příslušnými sloupci.

lab.číslo vzorku	Huerg. rozt g/l	RID IgG g/l	RID IgG1 g/l	Brix g/l syrovátka	Brix g/l kolostrum
318	4,5	13,1	5,4	27,2	29,8
126	6,5	21,1	8,7	32,7	38,1
174	8,3	43,5	18,1	34,5	40,6
297	14,8	49,1	20,4	37,7	42,5
166	20,9	60,0	24,9	42,5	48,1
87	13,9	60,0	24,9	39,5	44,5
121	17,0	62,5	25,9	38,6	43,8
56	12,1	73,3	30,5	42,2	46,1
256	15,5	76,3	31,7	42,2	47,2
55	14,9	79,4	33,0	41,5	46,1
70	13,2	79,4	33,1	34,5	37,0
276	19,0	86,1	35,8	43,4	48,1
209	18,9	93,2	38,8	49,5	53,6
118	25,9	97,0	40,4	42,9	47,4
57	22,9	101,0	42,1	48,8	52,4
190	23,1	101,0	42,1	46,8	55,8
243	23,8	109,4	45,5	54,9	59,5
295	25,8	109,4	45,5	56,1	63,1
150	19,8	118,5	49,3	46,5	51,3
89	20,7	123,4	51,4	47,4	49,7
2	11,0	133,7	55,7	36,1	43,6
244	26,9	139,1	58,0	59,0	64,5
307	27,7	144,8	60,3	53,1	56,5
76	23,1	163,3	68,1	54,0	61,3
40	23,4	170,0	70,8	53,4	59,0
30	23,6	170,0	70,8	47,9	52,7
248	28,3	191,7	79,9	53,7	67,2
99	21,9	199,6	83,2	59,5	63,6
78	23,2	253,8	105,9	56,7	62,2

0,999

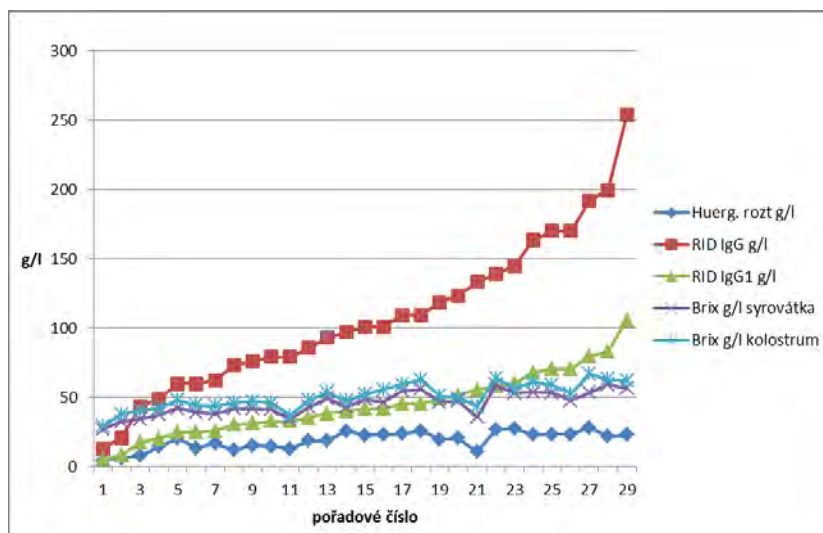
0,802

0,696

0,808

0,973

Graf č. 1 Grafické vyjádření tabulky č. 1



Z výše uvedeného srovnání vyplývá, že použité metody vykazují relativně vysoký stupeň vzájemné korelace. Nejvyšší stupeň korelace vykazují, logicky, obě varianty RID testu lišící se jen použitým standardem. Naopak nejnižší korelace byla zaznamenána v porovnání s metodou vysolováním síranem amonným. Tato metoda rovněž vykazovala malé difference mezi jednotlivými vzorky; z tohoto důvodu není vhodná pro kvantitativní stanovení IgG v mléce. Za povšimnutí stojí i fakt, že velmi vysoká míra korelace byla pozorována mezi výsledky dosaženými refraktometrickými měřeními kolostrálních syrovátek a celých koloster.

IV. Srovnání novosti postupu

RID metoda stanovení koncentrací IgG v séru telat, méně často i v mléčných sekretech krav, je standardní metodou používanou v řadě světových laboratoří. Předložená metodika modifikuje její použití pro potřebu kvantitativního stanovení v mléčných sekretech. Vzhledem k tomu, že neexistuje komerční souprava, která by toto stanovení umožňovala, navržená metodika zahrnuje i postup přípravy základních komponent.

V. Uplatnění funkčního vzorku

Metoda je používána na pracovišti autorů k výzkumným účelům a pro potřeby řešení projektu NAZV. Popsaný postup může být nabídnut dalším výzkumným a kontrolním pracovištím.

VI. Ekonomické aspekty

Metoda je na pracovišti autorů zavedena a používána. V případě zájmu jiných pracovišť, může jim být poskytnuta, případně, může jim být nabídnuto vyšetření jejich vzorků na komerční bázi.

VII. Patentová ochrana

Patentová ochrana není nutná.

VIII. Seznam citované literatury

Bielmann V, Gillan J, Perkins NR, Skidmore AL, Godden S, Leslie KE. An evaluation of Brix refractometry instruments for measurement of colostrum quality in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2010; 93:3713-21.

Fahey JL, McKelvey EM. Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. *J Immunol.* 1965; 94:84-90.

Fleenor WA, Stott GH. Hydrometer test for estimation of immunoglobulin concentration in bovine colostrum. *J Dairy Sci.* 1980; 63:973-7.

Gelsinger SL, Smith AM, Jones CM, Heinrichs AJ. Technical note: Comparison of radial immunodiffusion and ELISA for quantification of bovine immunoglobulin G in colostrum and plasma. *J Dairy Sci.* 2015; 98:4084-9.

Gross JJ, Kessler EC, Bruckmaier RM. Colour measurement of colostrum for estimation of colostral IgG and colostrum composition in dairy cows. *J Dairy Res.* 2014; 81:440-4.

Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry.* 1965; 2:235-54.

Molla A. Estimation of bovine colostral immunoglobulins by refractometry. *Vet Rec.* 1980; 107:35-6.

Moore DA, Taylor J, Hartman ML, Sischo WM. Quality assessments of waste milk at a calf ranch. *J Dairy Sci.* 2009; 92:3503-3509.

Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu **QJ1510219**, projektu Rozvoj výzkumné organizace RO0516 a projektu LO1218 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR v rámci programu NPU-I.

Vydal: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.

Hudcova 70, 621 00 Brno

Název: **Imunodifúzní test pro stanovení imunoglobulinů v kravském kolostru**

Autoři:

MVDr. Josef Krejčí

Hana Kudláčková

Mgr. Radek Tesařík, Ph.D.

Mgr. Jan Gebauer

MVDr. Martin Faldyna, Ph.D.

MVDr. Soňa Šlosárková, Ph.D.

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu **QJ1510219**, projektu Rozvoj výzkumné organizace RO0516 a projektu LO1218 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR v rámci programu NPU-I.



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