

# Výskyt a vlastnosti bakterií *Staphylococcus aureus* ve vepřovém mase

Kolářková, I., Koukalová, K., Karpíšková, R.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.

## SOUHRN

Tato studie byla zaměřena na sledování kontaminace syrového vepřového masa bakteriemi *Staphylococcus aureus* v tržní síti a jejich schopnosti podílet se na vzniku alimentárních intoxikací. Kmeny byly charakterizovány genotypovými metodami. Ze 197 vyšetřených vzorků byly ve 43 (21,8 %) detekovány bakterie *S. aureus*. Schopnost produkovat enterotoxiny byla potvrzena u 21 (48,8 %) izolátů, gen zodpovědný za tvorbu enterotoxinu H byl potvrzen nejčastěji (81 %). U všech izolátů

byla sledována rezistence k antimikrobiálním látkám diskovou difuzní metodou a přítomnost genu *mecA* zodpovědného za rezistenci k meticilinu (MRSA). Dva kmeny izolované v této studii nesly gen *mecA* (MRSA). U obou izolátů byla potvrzena příslušnost k sekvenčnímu typu 398 (ST398).

## KLÍČOVÁ SLOVA

MRSA – tržní síť – enterotoxiny – rezistence

## ABSTRACT

**Kolářková, I., Koukalová, K., Karpíšková, R.: Occurrence and characteristic of *Staphylococcus aureus* in pork meat**

This study was conducted to evaluate the contamination of raw pork meat with *Staphylococcus aureus* in retail market and their ability to participate in the creation of foodborne intoxication. Strains were characterized by genotypic traits. Of the 197 samples examined 43 (21.8%) were found to be positive for the presence of *S. aureus*. Toxigenic properties were found in 21 (48.8%) isolates, the major enterotoxigenic

gene found was *seh* (81%). All the *S. aureus* isolates were screened for resistance to antimicrobial agents by disk diffusion method and for *mecA* gene encoding resistance to methicillin. Two of the strains isolated in this study harboured the *mecA* gene (MRSA). The determination of sequence type 398 (ST398) has been confirmed in both MRSA isolates.

## KEYWORDS

MRSA – detail – enterotoxins – resistance

*Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.*, 63, 2014, č. 3, s. 191–194

## ÚVOD

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) je bakterií, která se významnou měrou podílí na vzniku alimentárních intoxikací bakteriálního původu [12]. Výskyt tohoto etiologického agens je popisován u lidí i zvířat. U lidí se vyskytuje zejména na sliznicích a kůži, přibližně 20 % dospělých osob je dlouhodobě osídleno bakteriemi *S. aureus* a přibližně 60 % osob je kolonizováno v průběhu svého života intermitentně [21]. Infikována či kolonizována mohou být i potravinová zvířata a při následném jatečném opracování se mohou bakterie *S. aureus* přenést i na jatečně opracovaná těla [8]. Zdrojem kontaminace suroviny může ale být i prostředí a personál jatečných a maso zpracujících provozů nebo pracovní pomůcky a pracovní plochy v obsluhovaných úsecích prodeje masa v tržní síti.

Z pohledu bezpečnosti potravin je výskyt bakterií *S. aureus* v porcovaném mase distribuovaném v tržní síti významný, zejména kvůli své schopnosti produkovat termostabilní stafylokokové enterotoxiny, které u spotřebitelů mohou vyvolat stafylokokovou enterotoxikózu. V současné době je popsáno 21 stafylokokových enterotoxinů, ale v souvislosti se vznikem enterotoxikózy jsou popisovány pouze enterotoxiny A, B, C, D, E a H. [18].

Rezistence bakterií k antimikrobiálním látkám je v posledním desetiletí závažným problémem jak v humánní,

tak i veterinární medicíně. Bakterie *S. aureus* a meticilin-rezistentní *S. aureus* (MRSA) se vyskytují kromě humánní populace i u zvířat včetně potravinových. Tyto bakterie se rozšířily zejména v chovech prasat, jedná se o klonální komplex MRSA označovaný jako CC 398 [6]. Výskyt MRSA tohoto klonálního komplexu byl v chovech prasat poprvé popsán ve Francii [2]. Později se tento klonální komplex rezistentních stafylokoků rozšířil i v Nizozemí [23] a dalších evropských zemích, USA, Kanadě a Asii [19]. Tyto bakterie se mohou šířit nejen na farmách, ale také na jatcích, kde může docházet ke kontaminaci jatečně upravených těl a následně i vybouraného masa. Výskyt tohoto klonálního komplexu je již zaznamenáván také v populaci lidí [6]. Při šíření tohoto typu MRSA se diskutuje také o otázce možné kolonizace spotřebitelů při manipulaci s masem v domácnostech.

## MATERIÁL A METODY

### Odběr a charakteristika vzorků

Celkem bylo v roce 2012 a 2013 odebráno 197 vzorků chlazeného vepřového masa. Vzorky byly nakoupeny v tržní síti v 16 obchodech a obchodních řetězcích České republiky.

## SOUHRNNÁ SDĚLENÍ • PŮVODNÍ PRÁCE • KAZUISTIKY

Vzorky masa byly buď balené přímo výrobcem (90) nebo porcované v obsluhovaných úsecích s prodejem masa (107). Maso pocházelo ze tří zemí, 158 (80,2 %) vzorků z České republiky a 39 (19,8 %) bylo importováno, 31 vzorků z Polska a 8 z Rakouska.

Při odběru byly všechny vzorky individuálně zabaleny do mikrotenových sáčků, aby se zabránilo vzájemné kontaminaci vzorků a v chlazeném stavu byly transportovány do laboratoře, kde byly neprodleně vyšetřeny.

### Izolace bakterií *S. aureus*

V laboratoři byly odebrány stěry z povrchu masa pomocí sterilních houbiček (3MTM Sponge-stick, USA), které byly umístěny do sáčků s 30 ml pufrované peptonové vody (PPV, Oxoid, Velká Británie) a zhomogenizovány na zařízení typu Stomacher. Bakterie *S. aureus* byly ve vzorcích detekovány paralelně dvěma způsoby – izolací na médium Baird-Parker (Oxoid, Velká Británie) z pufrované peptonové vody inkubované při 37 °C po dobu 18–24 hodin a dále použitím metodiky s dvoustupňovým pomnožením. Po homogenizaci vzorku bylo 5 ml PPV přeneseno do média Mueller-Hinton (Oxoid, Velká Británie) s 6,5 % přídatkem NaCl a po inkubaci, která probíhala ve všech krocích při 37 °C 18–24 hodin, byl 1 ml inokulován do trypton-sojového bujonu s cefoxitinem (5 µg/ml) a aztreonamem (7,5 µg/ml) (Labmediaservis, CZ). Další den pak byla suspenze vyočkována na Baird-Parker agar a Brilliance™ MRSA 2 agar (Oxoid, Velká Británie). Typické kolonie ze selektivních agarů byly vyočkovány na půdu s přídatkem 5 % ovčí krve (Labmediaservis, CZ) a uchovány pro následnou charakteristiku.

### Identifikace suspektních bakterií *S. aureus*

Suspektní kolonie byly potvrzeny metodou PCR, byl detekován fragment specifický pro bakterie *S. aureus* o velikosti 108 bp [10].

### Detekce genů zodpovědných za produkci stafylokokových enterotoxinů

U každého kmene *S. aureus* bylo metodou PCR provedeno stanovení přítomnosti genů *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* podle protokolu popsáném autory Monday a Bohach [11] a Løvseth et al. [9].

### Stanovení rezistence k antimikrobiálním látkám

U kmenů *S. aureus* bylo provedeno stanovení rezistence k panelu 12 antimikrobiálních látek za použití diskové difúzní metody s antibiotickými disky firmy Oxoid (UK) na médiu Mueller-Hinton (Biokar, FR). Byla sledována rezistence k následujícím látkám: OXA, oxacilin (1 µg); TET, tetracyklin (30 µg); ERY, erytromycin (15 µg); SXT, sulfometoxazol s trimetoprimem (25 µg); CN, gentamicin (10 µg); DA, klindamycin (2 µg); C, chloramfenikol (30 µg); CTX, cefotaxim (30 µg); CIP, ciprofloxacin (5 µg); FOX, cefoxitin (30 µg); RD, rifampicin (5 µg); TEC, teikoplanin (30 µg). Jako kontrola byl použit kmen *S. aureus* ATCC 25923, výsledky byly interpretovány podle standardů CLSI [5].

### Detekce genu *mecA* a sekvenčního typu 398 metodou PCR

Všechny izolované kmeny byly testovány na přítomnost genu *mecA*, kódujícího rezistenci k meticilinu [4] a dále bylo provedeno potvrzení příslušnosti ke sekvenčnímu typu 398 podle autorů [22].

### Statistická analýza

Statistická analýza výsledků byla provedena programem STAT PLUS (VÚVEL, CZ).

## VÝSLEDKY A DISKUSE

### Prevalence *S. aureus* ve vzorcích masa

Ze 197 odebraných vzorků chlazeného masa byla přítomnost bakterií *S. aureus* potvrzena u 43 vzorků (21,8 %). Jednalo se o 31 vzorků masa baleného výrobcem a 12 vzorků masa z volného prodeje baleného v tržní síti. Rozdíly ve výskytu bakterií *S. aureus* ve vzorcích podle typu balení byly statisticky významné ( $p < 0,01$ ), překvapivě však byla zjištěna vyšší incidence stafylokoků ve vzorcích masa baleného přímo výrobcem. Tento fakt může být způsoben vyšší vodní aktivitou na povrchu masa balených vzorků a tím i lepšími podmínkami pro přežívání stafylokoků.

Prevalence bakterií *S. aureus* ve vepřovém mase se liší podle výsledků zveřejněných různými autory. Zatímco autoři Pesavento et al. [14] uvádí 15,5 % pozitivních vzorků (10/66), autoři O'Brien et al. [13] uvádí 67 % pozitivních vzorků masa (201/300).

### Prevalence genů zodpovědných za produkci stafylokokových enterotoxinů

U 15 kmenů byla zjištěna přítomnost genů zodpovědných za tvorbu enterotoxinů. Nejčastěji byl zjišťován gen *seh* (12), který kóduje produkci nově popsaného enterotoxinu H, jehož přítomnost se v potravinách (mase) nedá prokázat metodami běžně používanými pro průkaz klasických enterotoxinů. Přehled genů detekovaných u izolátů získaných v této studii je uveden v tabulce 1. Izoláty pocházely ze vzorků masa baleného i nebaleného a byly nakoupeny v různých obchodech a lokalitách. (Tab. 1)

Stafylokokový enterotoxin H byl charakterizován autory Ren et al. [16]. Jedná se o termostabilní protein, jehož schopnosti vyvolat enterotoxikózu byly již potvrzeny různými studiemi [15]. Tento enterotoxin není zařazen mezi klasické enterotoxiny, a proto se podle platné legislativy v potravinách ani neprokazuje. Běžně používané metody ke stanovení enterotoxinu v potravinách jako jsou ELISA a ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay, VIDAS) budou v přítomnosti enterotoxinu H vykazovat negativní výsledky. Také v České republice již byl výskyt genu *seh* u potravinových izolátů *S. aureus* opakovaně prokázán. Autoři Štátsková et al. [20] uvádí 5% prevalenci u izolátů ze syrového kravského mléka a 21% zastoupení genu *seh* v potravinách uvádí i autoři Růžičková et al. [17]. Také Kim et al. [7] uvádí výskyt genu *seh* u izolátů *S. aureus* získaných z potravin určených k přímé spotřebě z tržní sítě v Koreji za častý.

### Stanovení rezistence k antimikrobiálním látkám

Rezistence izolátů *S. aureus* alespoň k jedné z testovaných antimikrobiálních látek byla zjištěna v 27,9 % případů (12/43). Z celkem 12 rezistentních kmenů jich 6 bylo izolováno z importovaných vzorků (50 %). Nejčastěji byla zjištěna rezistence k erytromycinu 14 % (6/43), následovaná rezistencí ke klindamycinu 9,3 % (4/43), tetracyklinu 7 % (3/43), gentamicinu a chloramfenikolu 4,7 % (2/43). Dva izoláty z vepřového masa vykazovaly rezistenci k oxacilinu, cefotaximu, klindamycinu a tetracyklinu. Metodou PCR u nich byla potvrzena přítomnost genu *mecA* a byly proto označeny jako meticilin rezistentní *S. aureus* (MRSA). Jeden z těchto izolátů byl rezistentní i ke chloramfenikolu a ciprofloxacinu. U obou kmenů byla dále zjištěna přítomnost úseku DNA specifického pro kmeny náležící k sekvenčnímu typu 398. Aktuální situace výskytu MRSA ve vepřovém mase v tržní síti v České republice není známa, tato studie uvádí první nálezy MRSA ve vepřovém mase u nás Autoři Agersø et al. [1] uvádí nálezy MRSA ve sledované komoditě následovně – 19 % v Nizozemí (3/16), 4,6 % v Dánsku (7/153)

## SOUHRNNÁ SDĚLENÍ • PŮVODNÍ PRÁCE • KAZUISTIKY

**Tabulka 1.** Vlastnosti izolátů *S. aureus* podle lokality, prodejny, typu balení, přítomnosti genů pro produkci enterotoxinů a rezistence k antimikrobiálním látkám**Table 1.** Characteristics of *S. aureus* isolates by locality, store, type of packing, presence of enterotoxigenic genes and resistance patterns

| Lokalita   | Obchodní řetězec | Země původu | Typ balení | Gen pro enterotoxin | Gen mecA | ST398   | Typ rezistence            | Počet izolátů |
|------------|------------------|-------------|------------|---------------------|----------|---------|---------------------------|---------------|
| Brno       | A                | ČR          | výrobce    | -                   | -        | -       | ERY                       | 1             |
|            |                  | PL          | výrobce    | seg, sei            | -        | -       | -                         | 1             |
|            |                  | PL          | výrobce    | seh                 | -        | -       | -                         | 1             |
|            |                  | PL          | výrobce    | seg, sei            | -        | -       | TET, ERY, DA              | 1             |
|            | B                | ČR          | výrobce    | seh                 | +        | +       | OXA, TET, DA, CTX         | 1             |
|            |                  | ČR          | výrobce    | -                   | +        | +       | OXA, TET, DA, C, CTX, CIP | 1             |
|            | C                | ČR          | výrobce    | -                   | -        | -       | -                         | 2             |
|            |                  |             |            | -                   | -        | -       | -                         | 1             |
|            | F                | ČR          | prodejna   | seh                 | -        | -       | ERY                       | 1             |
|            |                  |             |            | seh                 | -        | -       | ERY                       | 1             |
| PL         |                  | výrobce     | seh        | -                   | -        | -       | 1                         |               |
|            |                  |             | seh        | -                   | -        | DA, TEC | 1                         |               |
| G          | PL               | výrobce     | sec        | -                   | -        | ERY     | 1                         |               |
|            |                  |             | -          | -                   | -        | -       | 1                         |               |
| Litoměřice | A                | PL          | výrobce    | -                   | -        | -       | -                         | 4             |
|            |                  | A           | výrobce    | seh                 | -        | -       | -                         | 1             |
|            | H                | A           | výrobce    | -                   | -        | -       | -                         | 1             |
|            |                  |             |            | ČR                  | výrobce  | -       | -                         | -             |
|            |                  | ČR          | výrobce    | seh                 | -        | -       | -                         | 1             |
|            |                  |             |            | -                   | -        | -       | CN                        | 1             |
| ČR         | výrobce          | -           | -          | -                   | SXT, CN  | 1       |                           |               |
| Ostrava    | G                | ČR          | prodejna   | -                   | -        | -       | -                         | 2             |
|            |                  |             | prodejna   | seh                 | -        | -       | -                         | 2             |
|            | D                | PL          | výrobce    | seh                 | -        | -       | C                         | 1             |
|            |                  | PL          | výrobce    | seh                 | -        | -       | -                         | 3             |
|            | G                | PL          | výrobce    | -                   | -        | -       | -                         | 1             |
|            |                  |             |            | -                   | -        | -       | ERY                       | 1             |
| Příbram    | D                | ČR          | výrobce    | -                   | -        | -       | -                         | 1             |
|            |                  |             | výrobce    | seh                 | -        | -       | -                         | 1             |
| Šumperk    | E                | ČR          | prodejna   | -                   | -        | -       | -                         | 4             |
|            |                  |             | prodejna   | seh                 | -        | -       | -                         | 3             |

## Legenda:

ČR - Česká republika, PL - Polsko, A - Rakousko

C - chloramfenikol, CN - gentamycin, CIP - ciprofloxacín, CTX - cefotaxim, DA - klindamycin, ERY - erytromycin; OXA - oxacilin, SXT - sulfometoxazol s trimetoprimem, TEC - teikoplanin, TET - tetracyklin

Country of origin: ČR - Czech Republic, PL - Poland, A - Austria

Abbreviations: C - chloramphenicol; CN - gentamicin; CIP - ciprofloxacin; CTX - cefotaxim; DA - clindamycin; ERY - erythromycin; OXA - oxacilin; SXT - sulfamethoxazol/trimethoprim; TEC - teicoplanin; TET - tetracycline

a 2,1 % v Německu (3/142). V této studii byl potvrzen výskyt 1 % (2/197). V roce 2008 byl v České republice sledován výskyt MRSA v prostředí chovů prasat, byla potvrzena prevalence 1, 8 % (5/283) [3].

**ZÁVĚR**

Prevalence výskytu bakterií *S. aureus* ve vepřovém mase není vysoká (21,8 %), závažným ale může být výskyt kmenů nesoucích geny pro tvorbu stafylokokových enterotoxinů a kmenů s vícečetnou rezistencí k antimikrobiálním látkám.

V této studii bylo prokázáno, že ve vepřovém mase je dominantní výskyt kmenů *S. aureus* schopných produkovat

enterotoxin H. Vzhledem k termostabilitě stafylokokových enterotoxinů může být pokrm (potravina) obsahující kontaminované vepřové maso vehikulem intoxikace. Laboratorní vyšetření na přítomnost enterotoxinů v potravine však může vykazovat falešně negativní výsledky, protože běžně používané metody tento typ enterotoxinu nedetekují. Vepřové maso může být kontaminováno i multirezistentními kmeny *S. aureus* včetně MRSA. První výskyt těchto kmenů ve vepřovém mase v tržní síti v České republice popisuje tato studie.

Tato studie vznikla za finanční podpory Ministerstva zemědělství ČR, projektu NAZV KUS QJ1210284 a projektu MŠMT AdmireVet CZ 1.05/2.1.00/01.006ED.

## SOUHRNNÁ SDĚLENÍ • PŮVODNÍ PRÁCE • KAZUISTIKY

## Literatura

1. Agersø Y, Hasman H, Cavaco LM, Pedersen K, Aarestrup FM. Study of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Danish pigs at slaughter and in imported retail meat reveal a novel MRSA type in slaughter pigs. *Veterinary Microbiology*, 2012;157:246-250.
2. Armand-Lefevre L, Ruimy R, Andremont A. Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. *Emerging Infection Diseases*, 2005;11:711-714.
3. Bardoň J, Kolář M, Karpíšková R, Žemličková H, Fridrichová M, et al. Occurrence and characteristic of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farms in the Czech Republic. *Acta Veterinaria*, 2012;81;p. doi:10.2754/avb201281030000.
4. Boşgelmez-Tmaz G, Ulusoy S, Aridoğan B, Coşkun-Ari F. Evaluation of different methods to detect oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* and their clinical laboratory utility. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2006;25(6):410-412.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI Document M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, Pa, 2012.
6. Huijsdens XW, van Dijke BJ, Spalburg E, van Santen-Verheuevel, MG, Heck ME, et al. Community-acquired MRSA and pig-farming. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2006;5:26. DOI:10.1186/1476-0711-5-26.
7. Kim NH, Yun AR, Rhee MS. Prevalence and classification of toxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from refrigerated ready-to-eat foods (sushi, kimbab and California rolls) in Korea. *Journal of Applied Microbiology*, 2011;111:1456-1464.
8. Lee JH. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003;6489-6494.
9. Løvseth A, Loncarevic S, Berdal KG. Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004;42:3969-3872.
10. Martineau F, Picard JF, Roy HP, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998;36:618-623.
11. Monday SR, Bohach GA. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999;37:3411-3414.
12. Normanno G, Corrente M, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 2007;117:219-222.
13. O'Brien AM, Hanson BM, Farina SA, Wu JY, Simmering JE, Wardyn SE, Forshey BM, Kulick ME, Wallinga DB, Smith TC. MRSA in conventional and alternative retail pork products. *PLoS ONE*, 2012;7(1):e30092. doi:10.1371/journal.pone0030092.
14. Pesavento G, Ducci B, Comodo N, Lo Nostro A. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Food Control*, 2007;18:196-200.
15. Pospíšilová M., Karpíšková R. Případ stafylokokové enterotoxikózy vyvolané tetradicínem SEH. Zprávy CEM (SZÚ Praha), 2005;14:84-85.
16. Ren K, Bannan JD, Pancholi V, Cheung AL, Robbins JC, et al. Characterization and biological properties of a new staphylococcal exotoxin. *Journal of Experimental Medicine*, 1994;180:1675-1683.
17. Růžičková V, Karpíšková R, Pantůček R, Pospíšilová M, Černíková P, Doškař J. Genotype analysis of enterotoxin H-positive *Staphylococcus aureus* strains isolated from food samples in the Czech Republic. *International Journal of Food Microbiology*, 2008;121:60-65.
18. Schelin J, Wallin-Carlquist N, Cohn MT, Lindqvist R, Barker GC, Radström P. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*, 2011;2:580-592.
19. Smith TC, Pearson N. The emergency of *Staphylococcus aureus* ST398. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 2011;11:327-339.
20. Štátsková Z, Karpíšková R, Gelbíčová T, Vaňáč V, Tůma, et al. Detection of enterotoxigenic genes in *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank cow's milk samples in the Czech Republic. *Acta Alimentaria*, 2012;41:327 - 333.
21. van Belkum A, Melles DC, Nouwen J, van Leeuwen WB, van Wamel W, et al. Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 2009;9:32-47.
22. van Wamel WJB, Hansenová Maňásková S, Verbrugh H, van Belkum A. Short term micro-evolution and PCR-detection of methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398. *Eur. J. Clin. Microbiol Infect Dis*, 2010;29:119-122.
23. Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaasen C, Wulf M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerging Infection Diseases*, 2005;11:1965-1966.

Do redakce došlo dne 12. 2. 2014.

Adresa pro korespondenci:

**MVDr. Ivana Kolářková, Ph.D.**

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.  
Hudcova 296/70  
621 00 Brno  
e-mail: kolackova@vri.cz