

Sliny prasat jako vhodný diagnostický materiál – praktické zkušenosti

T. JIRÁSEK,1 P. VÁCLAVEK2

1MEVET spol. s r.o., Praha

2Státní veterinární ústav Jihlava

XXXX

SOUHRN

Jirásek T., Václavek P. Sliny prasat jako vhodný diagnostický materiál – praktické zkušenosti. Veterinářství 2014;64:

V posledních letech je v laboratorní veterinární diagnostice stále častěji využíván vzorek slin prasat. V praxi se potvrdilo, že sliny, resp. ústní tekutiny, lze využít k diagnostice některých závažných onemocnění, která mají vliv jak na zdraví, tak na rentabilitu komerčního chovu prasat. Mezi jinými se vzorek slin osvědčil v diagnostice porcinního reprodukčního a respiračního syndromu (PRRS), viru chřipky (SIV) a porcinního cirkoviru typu 2 (PCV2). Sliny jako vzorek mají široký potenciál a práce na vývoji nových testů a na validaci stávajících testů k využití vzorku slin prasat dále probíhají. Odběr vzorků slin a jejich vyšetření mají svá specifika. Jedná o jednoduchou, neinvazivní techniku odběru diagnostického vzorku, bez stresu prasat. Směsný vzorek je reprezentativní pro danou populaci prasat a lze ho využít pro cenově výhodný monitoring vybraných chorob. Považujeme za nutné informovat naši veterinární a chovatelskou obec o technice odběru vzorků, ale i o možnostech, benefitech a limitech tohoto způsobu vzorkování a vyšetření.

SUMMARY

Jirásek T., Václavek P. Porcine oral fluid samples as appropriate diagnostic material – practical experience. Veterinářství 2014;64:

Porcine oral fluid sample is increasingly used in veterinary laboratory diagnostics in recent years. In practice was confirmed that saliva, respectively oral fluids can be used to diagnose certain serious diseases that affect both the health and the profitability of commercial pig farming. Among others, the saliva sample has proved well in the diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), influenza virus (SIV), and porcine circovirus type 2 (PCV2). Saliva as a sample have huge potential and the work on the development of new tests as well as the validation of existing tests to use oral fluid of pigs continue. Sampling and examination of saliva have their own characteristics. It is a simple, non-invasive diagnostic sample collection technique, without any stress of pigs. A pooled sample is representative for certain population of pigs and can be used for cost effective monitoring of selected diseases. We consider it necessary to inform our veterinary and breeding community of sampling technique, but also the opportunities, benefits and limitations of this method of sampling and examination.

Úvod

Sliny prasat, resp. jejich ústní tekutiny, se nabízí jako vhodný biologický materiál k laboratorní diagnostice některých významných onemocnění. Ze slin prasat je možná jak přímá detekce patogenů,

tak i specifických protilátek proti nim jako např. PRRSV^{1,2} a PCV2², virus chřipky prasat⁵ a *Erysipelothrix rhusiopathiae*⁶. Ve slinách můžeme rovněž detekovat antibiotika⁷ a poslední výzkum se zaměřuje

také na detekci proteinů akutní fáze.⁸ U prasat docílíme získání vhodného vzorku slin tak, že umístíme absorpční materiál, tj. bavlněný provaz, do kotce a ponecháme ho určitou dobu zvířata žvýkat. Tato technika je stále častější praxí ve veterinární medicíně. Hlavní výhodou je, že se jedná o jednoduchou, neinvazivní techniku odběru diagnostického vzorku, který je zároveň reprezentativní pro danou populaci prasat a lze ho využít pro cenově výhodný monitoring vybraných chorob.

Sliny či ústní tekutiny?

Běžně užívaný pojem „sliny“ je v těchto souvislostech nesprávný a měl by se užívat spíše pojem ústní tekutiny (z angl. *oral fluids*). Ústní tekutiny jsou složeny z vlastních slin, které jsou sekretem slinných žláz, dále pak ze slizničního transudátu, cervikální gingivální tekutiny, buněčného detritu, enzymů, antiseptických látek, zbytků potravy a bakterií.⁹ V případě infekce pak ústní tekutiny obsahují patogeny (lokální či z oběhové soustavy) a protilátky (lokální či sérové). Jako lokální patogeny zde můžeme detekovat např. virus klasického moru prasat, který se replikuje v tonsilách.² Lokální protilátky pocházejí ze slinných žláz (B buňky) a lymfoidní tkáně (B buňky MALT/DALT). Z krve se pak do slin dostávají pomocí slizničního transudátu různé jiné patogeny (např. virus PRRS)¹¹, sérové protilátky (IgM, IgG), antibiotika, léky apod.^{2,9}

Historie využití slin v diagnostice

Využití slin v diagnostice není nové v oblasti humánní medicíny.⁹ Přítomnost specifických protilátek ve slinách byla poprvé prokázána již v roce 1909 v souvislosti s tzv.

Tab. 1 – Testy k diagnostice chorob ze slin prasat, které byly zavedeny na oddělení virologie SVÚ Jihlava

Patogen	Průkaz viru/protilátek	Diagnostický test
PRRSV	virus	konvenční RT PCR
		nested PCR
		qRT PCR
	protilátky	ELISA IDEXX PRRS Oral Fluids Ab test
PCV-2	virus	qReal-Time PCR
	protilátky	SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking ELISA – semikvantitativní (Synbiotics + Merial/LDA22)
SIV	virus	RT PCR

Maltskou horečkou (*Brucella melitensis*).² Nyní jsou využívány testy ze slin lidí např. na spalničky, HIV, Epstein-Barr virus, hepatitidu (A, B, C), příušnice, zarděnky, *M. tuberculosis*, SARS, parvovirus, herpesvirus a další.^{2,9} V některých případech, jako např. HIV, byly vyvinuty i tzv. rychlé testy (10-20 min.). Další biomarkery ve slinách jsou v humánní medicíně využívány např. v diagnostice karcinomů hlavy a krku, k diagnostice periodontitidy, k detekci zubního kazu, ale i k monitoringu drog a jejich metabolitů (např. THC).⁹

Ve veterinární diagnostice byly sliny jako diagnostický vzorek doposud velmi málo využívané. Ve výkrmu skotu byly používány k detekci *Escherichia coli* O157:H7 a *Salmonella sp.*¹², u koček k diagnostice viru kočičí leukémie a experimentálně též v souvislosti s možným přenosem některých chorob jako např. viru vztekliny.² U prasat byl ve slinách experimentálně potvrzen výskyt specifických protilátek po infekci *Streptococcus* sk. E (1973), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (1993) a podjednotky B cholera toxinu (2004).²

Současné možnosti laboratorní diagnostiky ze slin prasat

U prasat byla ověřena diagnostika ze slin např. viru AMP¹³, viru KMP, viru SLAK, viru Aujeszkyho choroby a viru vezikulární stomatitidy. Ovšem nejčastější využití nachází v praxi vzorek slin při detekci viru PRRS,^{10,14,18} viru chřipky⁵ a PCV-2.¹⁵ a to jak přímým průkazem viru, tak průkazem specifických protilátek. Nejisté zatím je využití slin k přímé detekci *Mycoplasma hyopneumoniae* a to kvůli možným falešně negativním výsledkům v testu PCR. Je známo, že k intravitální přímé diagnostice *Mycoplasma hyopneumoniae* jsou vhodnější spíše hluboké výtěry a laváže. Limity má i přímý průkaz *Actinobacillus pleuropneumoniae* ze slin, neboť byly zaznamenány pozitivní výsledky v testu PCR pouze 1.-7. den po infekci.¹⁶ Další výzkum využití vzorků slin prasat bude pravděpodobně následovat v diagnostice *Mycoplasma hyorhinis*, *Lawsonia intracellularis*, viru PED (porcinní epidemická diarhoea), *Salmonella sp.*, *Haemophilus parasuis* a ve sledování ATB (monitoring, odbourávání apod.).

V tabulce č. 1 jsou uvedeny testy určené k diagnostice chorob ze slin u prasat, které byly zavedeny na oddělení virologie SVÚ Jihlava, byly zde validovány v mezinárodním kruhovém testu a jsou zde již téměř dva roky využívány k rutinní diagnostice. Aby se zabránilo falešně negativním výsledkům, PCR testy určené původně k detekci ze séra či tkáně bylo nutno validovat na novou matici tj. sliny.^{15,17} ELISA testy byly většinou zásadními kroky přizpůsobeny na detekci protilátek ze slin – např. optimalizované ředění vzorku, změna v inkubaci vzorků, změna konjugátu apod.^{1,18}

Postup odběru a zpracování vzorku

Nejvhodnějším materiálem pro odběr vzorku slin je bavlněný provaz (viz obr. 1). Dobře absorbuje a snadno z něj



Obr. 1 – Souprava pro odběr vzorku slin prasat – bavlněné lano, zkumavka, igelitové sáčky a rukavice



Obr. 2 – Bavlněný provaz zavěšený v kotci



Obr. 3 – Vyždímání bavlněného provazu po zhruba 30 min



Obr. 4 – Slití získaných tekutin do jednoho rohu plastového sáčku, opačný roh odstříhneme

vytlačíme dostatečné množství tekutin pro požadované vyšetření. Co se týče síly provazu, pro odchovny je vhodný průměr 1,3 cm a pro prasata ve výkrmu okolo 1,6 cm. Doporučuje se dávat jeden provaz na 10-25 prasat. Celý postup odběru vzorků slin je poměrně jednoduchý.^{1,2,4}

Jednotlivé kroky odběru vzorků jsou:

Uvážeme bavlněný provaz do kotce se zvířaty. Je třeba dbát na důkladné upevnění a správnou délku provazu. Provaz uchytneme tak, aby byl konec cca ve výšce rypáku či lopatky prasat. Měla by na něj snadno dosáhnout, zároveň ale musíme zamezit kontaminaci provazu trusem, močí a krmivem. Nečistý vzorek často značí, že je provaz moc dlouhý. Je vhodné provaz dát na místo, kam mohou všechna prasata, pokud možno v čistší části kotce a ne přímo u zdroje vody a u krmiva.

Zavěšený provaz ponecháme zvířatům pro žvýkání alespoň po dobu 30min (viz obr. č. 2). V praxi se potvrzuje, že u prasat zvyklých na provaz je 20-30 min. dostatečný čas na to, aby se na něm vystřídalo 70 – 90 % zvířat z kotce (25 kusů/kotec), což je již dostatečně reprezentativní vzorek pro celou skupinu.³

Provaz vyždímáme do plastového sáčku, získanou tekutinu slejeme do jednoho rohu sáčku, druhý roh odstříhneme a překlopením přelejeme vzorek do přiložené zkumavky (nejlépe 50ml plastová zkumavka).

Optimální je, když získáme alespoň 4 – 5 ml ústních tekutin, což nebývá problém (viz obrázky 3 – 5).

Takto získaný vzorek ihned zchladíme a co nejdříve transportujeme do laboratoře, která je schopná vzorky ústních tekutin vyšetřit (obr. 6 a 7).

Při odběru slin v rámci různých kategorií většinou bez problému odebereme vzorky u starších zvířat na odchovnách a ve výkrmu, popř. odchovávané prasničky. Dospělá zvířata jsou ne vždy ochotna dostatečně žvýkat provaz, a proto je doporučován trénink a ochucování žvýkacích provazů (např. roztokem cukru, nebo džusem). Ochucování provazu pomáhá i u selat, která jsou nemocná, nebo při trénování mladých selat. Vzorkujeme spíše ráno, kdy jsou prasata více aktivní a úspěšnost odběru se tím zvyšuje. Na porodně se doporučuje vzorkovat spíše starší selata kolem 20 – 25. dne, která jsou agresivnější a provaz je více přitahuje než mladší selata. Doporučujeme po odběru pokaždé odstranit z kotců všechny provazy. Chybou by bylo nechávat provaz v kotci i přes noc, protože pak tato hračka ztrácí na atraktivitě a prasata se o něj přestanou zajímat. Použitý provaz nikdy nepoužijte znovu k dalším odběrům.

Jak zacházet se vzorkem slin

Po celou dobu přepravy vzorku do laboratoře je velmi důležité zachovat chladicí řetězec. Vzorky, které budou



Obr. 5 – Slití vzorku slin do zkumavky

odeslány v den odběru, je nutné zachladit a rychlé odeslat do laboratoře ($4\pm 3^{\circ}\text{C}$), nejlépe v chladicím boxu či na ledu. Pokud nelze vzorky doručit do laboratoře v den odběru, je nutné vzorky slin okamžitě po odběru zamrazit. Tato opatření jsou nutná, neboť sliny obsahují mnohé bakterie a enzymy a např. virus PRRS a jeho RNA ve slinách velmi rychle degradují. Chladicí proces tuto degradaci zpomaluje. K dalšímu zpracování vzorků slin dochází v laboratoři. Číré vzorky slin není potřeba dále zpracovávat, výrazně znečištěné vzorky centrifugujeme 10 minut (1000g při 4°C) a pak přepipetujeme do čisté zkumavky. Testován je pak v ELISA testu supernatant.

Strategie vzorkování

Sliny jsou směsný vzorek reprezentující danou populaci (kotec). Provádíme tak diagnostiku na úrovni stáda a sliny jako vzorek nám tak poskytují možnost cenově výhodného programu surveillance. Stojí za úvahu, zda nenahradit rutinní surveillance, kdy se testuje 1x30 vzorků sér za měsíc, několika vzorky slin za týden.¹⁰ Počet vzorků (počet provazů) a frekvence vzorkování závisí na počtu zvířat (na farmě, v kotci), prevalenci onemocnění, specifitě a sensitivitě diagnostického testu a na důvodu testování (diagnostika onemocnění, monitoring).

Pokud bychom prováděli diagnostiku onemocnění (PRRS, PCV2, SIV), mělo by se použít dva až pět provazů (vzorků) na jednu farmu/halu. Co se týče načasování odběru, u nemocných zvířat s akutní infekcí, kde pravděpodobně probíhá virémie, budeme testy směřovat na přímý průkaz viru metodou PCR (např. PRRSV dva až pět týdnů virémie). Po odeznění klinických příznaků, kdy nastupuje sérokonverze, lze využít průkazu specifických protilátek testem ELISA. Na monitoring za účelem určení nakažového statusu stáda (např. status selat - PRRSV, SIV) doporučujeme 3 provazy (vzorky) na farmu/halu ve věku 10 týdnů.^{10,14}

Některé praktické aspekty

Olsen C. a kol.⁴ testovali dvě PRRSV pozitivní farmy a celkem 104 kotců zvířat. Zjišťovali vliv použití bavlny,



Obr. 6 – Vzorek slin, resp. ústních tekutin, v plastové 50ml zkumavce

konopí a nylonu. Polovina vzorků byla zpracovaná (centrifugace a filtrace) a polovina nezpracovaná. Zároveň odebrali sérum od pěti prasat z každého kotce. Sledovali protilátky proti viru PRRS a celkové množství imunoglobulinů (IgA, IgM a IgG). Nezpracované vzorky byly testovány na PRRS pomocí qRT-PCR a zpracované vzorky na PRRS neutralizační protilátky. Výsledky ukázaly, že použitý materiál neměl vliv na IgG PRRS protilátky v testu ELISA, ale materiál zásadně ovlivnil výsledky qRT-PCR, hladinu PRRSV neutralizačních protilátek a hladiny IgA a IgM. Zpracování vzorků také významně ovlivnilo výsledky kvantifikace, a to pravděpodobně snížením koncentrace virové RNA. Nejvyšší počet pozitivních vzorků qRT-PCR byl dosažen pomocí bavlny.⁴

Seddon M.Y. a kol.³ porovnávali ochotu žvýkat poskytnuté provazy u 155 prasat ustájených na roštích (4 kotce) a na podestýlce, slámě (4 kotce). Dospěli k závěru, že provazy jsou více atraktivní pro prasata chovaná na roštích, kde působí jako nový stimul pro explorační chování. Ke zvýšení atraktivity na slámě nedošlo ani po umístění více provazů do prostředí. Jako plně dostatečná se jeví doba 45 min., kdy v průběhu této periody žvýkalo provaz minimálně 80% zvířat z daného kotce, přičemž nejvyšší nárůst počtu zvířat žvýkajících provaz byl v průběhu prvních 15 min. Reprezentativnost vzorku lze vylepšit umístěním dalšího provazu v případě roštového ustájení. V průběhu této studie odpovídal vzorek získaný z jednoho provazu skupině 17-24 zvířat.³



Obr. 7 – Vzorek připravený k zachlazení a k transportu do laboratoře

Prickett J.R. a kol.² jako první validovali techniku odběru vzorků slin a diagnostiku PRRS a PCV2 v komerčních chovech prasat. Na třech farmách byly opakovaně odbírány vzorky slin prasat z šesti kotců každé farmy (20-30 prasat/kotec). Odběry byly ve třetím týdnu stáří, a potom 5., 8., 12. a 16. týden, přičemž uvádějí, že virus PRRS je detekovatelný po dobu tří až osm týdnů a PCV2 déle než osm týdnů. Metoda vzorkování slin je podle této studie vhodná pro zdravotní monitoring PRRS a PCV2 ve stádě s odběrem ve dvou až čtyřtýdenních intervalech.²

Závěr

Nabízí se otázka, zda mohou vzorky slin nahradit vzorky séra např. v surveillance PRRSV. Je zřejmé, že vzorky slin jsou výbornou novou pomůckou pro veterinární lékaře i epidemiology. Je také pravdou, že vzorky slin jsou sice reprezentativní pro populaci, ale nemohou nikdy zcela nahradit individuální vzorky v některých specifických situacích, jako např. u kvantitativního vyhodnocování výsledků (např. qPCR u PCV2), či při snaze o izolaci/sekvenaci mikroorganismů (ze slin problematické). Jistou nevýhodou zůstává nutnost zachování chladicího řetězce a způsob odeslání vzorků slin, což zásadně ovlivňuje kvalitu výsledků. Je správné poukázat, že vzorkování slin je nevhodné či přímo nepoužitelné v některých případech pro sající selata a pro prasnice. Podstatné rovněž je, že pro vyšetření slin jsou nutné specifické laboratorní testy. Využití slin jako vzorku pravděpodobně není vhodné pro některé rutinně testované patogeny jako např. APP či *M. hyopneumoniae*. Výhodou testování slin zůstává možnost cenově výhodného monitoringu populace (PRRSV, PCV2, SIV), popř. programu surveillance. Důležité je, že se jedná o jednoduchý neinvazivní odběr vzorku bez stresu zvířat. Zjednodušené vzorkování by tak mohlo umožnit rozsáhlý monitoring, častější testování, vyšší sensitivitu na úrovni farmy a poskytnout tak přesnější mapování epidemiologické situace. Pokud vezmeme v potaz i ekonomickou stránku s celkově nižšími náklady na odběr a testování, může mít využití vzorků slin prasat v budoucnu zásadní význam.

Literatura:

1. Kittawornrat, A., Prickett, J., Wang, C., Olsen, C., Irwin, C., Panyasing, Y., Ballagi, A., Rice, A., Main, R., Johnson, J., Rademacher, C., Hoogland, M., Rowland, R., Zimmerman, J. Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies in oral fluid specimens using a commercial PRRSV serum antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Diagn Invest.* 2012;24(2):262-269.
2. Prickett, J. R., Kim, W., Simer, R., Yoon, K. J., Zimmerman, J. Oral- fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and circovirus type 2 infections. *J Swine Health Prod* 2008;16:86-91.
3. Seddon, M. Y., Guy, H. J., Edwards, A. S. Optimising oral fluid collection from groups of pigs: Effect of housing system and provision of ropes. *Vet Journal* 2012;193:180-184.
4. Olsen, C., Karriker, L., Wang, C., Binjawadagi, B., Renukaradhya, G., Kittawornrat, A., Lizano, S., Coetzee, J., Main, R., Meiszberg, A., Panyasing, Y., Zimmerman, J. Effect of collection material and sample processing on pig oral fluid testing results. *Vet J* 2013;198(1):158-63.
5. Detmer, S. E., Patnayak, D. P., Jiang, Y., Gramer, M. R., Goyal, S. M. Detection of Influenza A virus in porcine oral fluid samples. *J Vet Diagn Invest* 2011;23(2):241-7.
6. Giménez-Lirola, L. G., Xiao, C. T., Zavala, M., Halbur, P. G., Opriessnig, T. Improving ante mortem diagnosis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection by use of oral fluids for bacterial, nucleic acid, and antibody detection. *J Microbiol Methods* 2013;92(2):113-21.
7. Meiszberg, et al., Detection of ceftiofur and oxytetracycline in oral fluids of swine with pen-side competitive ELISA test after intramuscular injection. *J Vet Pharmacol Therap* 2011;34:515-517.
8. Gutiérrez, A. M., Martínez-Subiela, S., Soler, L., Pallarés, F. J., Cerón, J. J. Use of saliva for haptoglobin and C-reactive protein quantifications in porcine respiratory and reproductive syndrome affected pigs in field conditions. *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 132, 218-223.
10. Pink, R. Hladina neutrofilů ve slině jako pomocný ukazatel úspěšnosti přihojení neutrofilů po autologní transplantaci periferních krvetvorných buněk. LF Univerzita Palackého v Olomouci. 2008:1-70.
11. Kittawornrat, A., Engle, M., Johnson, J., Prickett, J., Schwartz, T., Whitney, D., Olsen, C., Chittick, W., Schwartz, K., Wang, C., Zimmerman, J. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance? *Virus Res* 2010;154:170-176.
12. Prickett, J., Simer, R., Christopher-Hennings, J., Yoon, K. J., Evans, R. B., Zimmerman, J. J. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: A longitudinal study under experimental conditions. *J Vet Diagn Invest* 2008;20:156-163.
13. Smith, D. R., Moxley, R. A., Clowser, S. L., Folmer, J. D., Hinkley, S., Erickson, G. E., Klopfenstein, T. J. Use of rope devices to describe and explain the feedlot ecology of *Salmonella* by time and place. *Foodborne Pathol Dis* 2005;2:61-69.
14. Mur, L., Gallardo, C., Soler, A., Zimmermann, J., Pelayo, V., Nieto, R., Sánchez-Vizcaino, J. M., Arias M. Potential use of oral fluid samples for serological diagnosis of African swine fever. *Vet Microbiol* 2013;165(1-2):135-139.
15. Ramirez, A., Wang, C., Prickett, J. R., Pogranichniy, R., Yoon, K. J., Main, R., Johnson, J. K., Rademacher, C., Hoogland, M., Hoffmann, P., Kurtz, A., Kurtz, E., Zimmerman, J. Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Prev Vet Med* 2012;104(3-4):292-300.
16. Prickett, J. R., Johnson, J., Murtaugh, M. P., Puvanendiran, S., Wang, C., Zimmerman, J. J., Opriessnig, T. Prolonged Detection of PCV2 and Anti-PCV2 Antibody in Oral Fluids Following Experimental Inoculation. *Transbound Emerg Dis* 2011;58:121-127.
17. Costa, G., Oliveira, S., Torrison, J., Dee, S. Evaluation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* diagnostic tests using samples derived from experimentally infected pigs. *Vet Microbiol* 2011;148(2-4):246-51.
18. Chittick, W. A., Stensland, W. R., Prickett, J. R., Strait, E. L., Harmon, K., Yoon, K. J., Wang, C., Zimmerman, J. J. Comparison of RNA extraction and real-time reverse transcription polymerase chain reaction methods for the detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine oral fluid specimens. *J Vet Diagn Invest* 2011;23(2):248-53.
19. Kittawornrat, A., Wang, C., Anderson, G., Ballagi, A., Broes, A., Carman, S., Doolittle, K., Galeota, J., Johnson, J., Lizano, S., Nelson, E., Patnayak, D., Pogranichniy, R., Rice, A., Scherba, G., Zimmerman, J. Ring test evaluation of the repeatability and reproducibility of a Porcine reproductive and respiratory syndrome virus oral fluid antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Diagn Invest* 2012;24(6):1057-63.

Adresa autora:
MVDr. Tomáš Jirásek
MEVET spol. s r.o.
Pod Svahem 1791/6a
Praha 4