

# Zastosowanie analizy restrykcyjnej wirusowego DNA w badaniach nad chorobą Aujeszkiego

Zakład Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Choroba Aujeszkiego (chA), wywoływana przez *Herpesvirus suis* 1 (4), stanowi istotne zagrożenie dla producentów trzody chlewnej na całym świecie (34). Zastosowanie w początkach lat osiemdziesiątych (14, 28, 31, 32) analizy restrykcyjnej do badań nad kwasem dezoksyrybonukleinowym (DNA) wirusa chA (Aujeszki's disease virus – ADV) pozwoliło w efekcie na dość dokładne poznanie jego struktury (29).

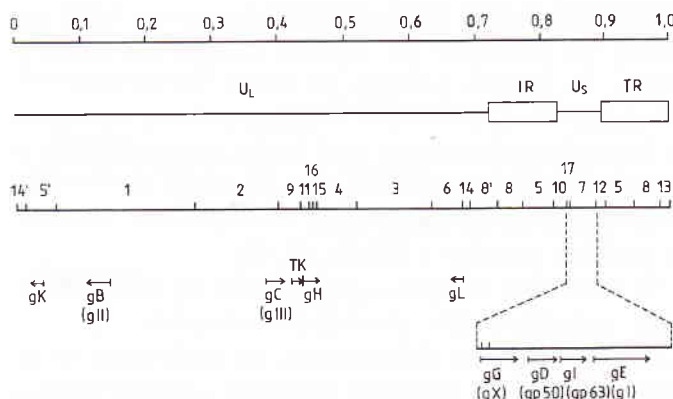
Wirion ADV zawiera nukleokapsyd, w którym mieści się genom zbudowany z liniowego, dwuniciowego DNA o długości 150 tys. par zasad. Dookoła kapsydu występuje bezpostaciowa struktura zwana „tegument”, zaś całość obejmuje otoczkę. Wirusowy DNA składa się z dwu kowalentnie połączonych jednostek – długiej (Unique long – U<sub>L</sub>) i krótkiej (Unique short – U<sub>S</sub>). Jednostka krótka ograniczona jest dwoma, wewnętrzną (Internal repeat – IR) i zewnętrzną (Terminal repeat – TR), odwróconymi, powtarzającymi się sekwencjami nukleotydów (ryc. 1). Biorąc pod uwagę wielkość DNA wirusa chA zakłada się, że może on zawierać około 70 genów, przy czym pełną sekwencję określono w odniesieniu do 40 z nich (29). Kodowane przez nie enzymy,

białka i glikoproteidy posiadają różne funkcje oraz przeznaczenie. Poznanie ich roli w procesie zakażenia, w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*, stało się możliwe dzięki inżynierii genetycznej, której to metodami konstruowano mutanty pozbawione konkretnych genów oraz analizie restrykcyjnej badającej genotypy powstałych szczepów.

Jedną z podstawowych, badanych cech wirusa chA, poddanych ocenie powyższymi metodami, była jego zdolność do namnażania się i zasiedlania komórek układu nerwowego. Wykazano, że niezwykle istotne znaczenie w tym zakresie posiada enzym – kinaza tymidylanowa (thymidine kinase – TK). Chemiczna inaktywacja lub wręcz usunięcie z genomu ADV genu kodującego TK obniża bardzo wyraźnie zakaźność tak przygotowanych szczepów wirusa chA, przy niezmiennych zdolnościach do namnażania się *in vitro* (29).

Poza wymienionym wirusowy DNA koduje szereg innych enzymów, których unieczynnienie wydaje się również mieć wpływ na zjadliwość ADV. Prowadzone na ten temat prace są w stadium początkowym i na pełne ich wyniki należy jeszcze poczekać (29).

Istotny wpływ na właściwości wirusa chA mają także glikoproteidy otoczkowe. Odgrywają one znaczącą rolę w interakcji pomiędzy zarazkiem a organizmem zwierzęcia w procesie zakażenia komórek docelowych oraz wywoływania reakcji immunologicznych (29). Dotychczas wykryto 8 strukturalnych glikoproteidów oznaczonych, według ujednoliconej obecnie dla wszystkich herpeswirusów nomenklatury, jako gB (gII), gC (gIII), gD (gp50), gE (gI), gI (gp63), gH, gL i gK; w nawiasach podano stare – oryginalne nazwy glikoproteidów ADV (29). Lokalizację genów poszczególnych glikoproteidów (oraz kinazy tymidylanowej) w genomie wirusa chA przedstawiono schematycznie na ryc. 1. Spośród wymienionych białek gB, gD, gH i gL określane są jako podstawowe, niezbędne dla replikacji wirusa, natomiast pozostałe: gC, gE i gI uważa się za glikoproteidy niepodstawowe. Oznacza to, że usunięcie z genomu ADV genu któregośkolwiek z trzech wymienionych białek, nie ma wpływu na namnażanie



Ryc. 1. Liniowy schemat DNA wirusa choroby Aujeszkiego (wg 29).

Cyfry arabskie – numery kolejnych fragmentów restrykcyjnych wirusowego DNA powstałych w wyniku trawienia endonukleazą BamHI. Pozostałe objaśnienia – w tekście

się tak skonstruowanych szczepów w hodowlach komórkowych. Ponadto wykryto sekrecję niestrukturalnego, niepodstawowego glikoproteidu gG (gX) przez zakażone wirusem chA komórki *in vitro* (29).

Wymienione wyżej białka w różny sposób wpływają na przebieg procesu zakażenia. Glikoproteid gC, odgrywający istotną rolę w pobudzaniu odporności komórkowej, warunkuje pierwotną adsorpcję cząsteczki wirusowej do powierzchni zaatakowanej komórki docelowej. Silniejsze, wtórne, powiązanie wirusa z komórką umożliwia glikoproteid gD, będący jednocześnie podstawowym immunogenem ADV powodującym powstawanie humoralnych przeciwciał neutralizujących. Wykorzystując laboratoryjne rekombinowane szczepy ADV – pozbawione gC – można również doprowadzić do infekcji wrażliwych komórek przez wirus; za jego adsorpcję odpowiedzialny jest w takich przypadkach wyłącznie glikoproteid gD. Ponadto białko to umożliwia ADV przekraczanie przerw międzysynaptycznych przy zakażeniu wewnątrzneuronowym (29).

Kolejnym etapem zakażenia jest wnikanie wolnego wirionu – nukleokapsydu do komórki docelowej. Istotną rolę odgrywają tu gB i gD oraz funkcjonalny kompleks niekowalently połączonych ze sobą, w postaci heterodimeru, glikoproteidów gH i gL.

Po przedostaniu się kapsydu do wnętrza komórki następuje złożony proces replikacji wirusa. Powstałe w jej wyniku potomne, zakażne cząsteczki mogą wydostawać się na zewnątrz zakażonej komórki a na proces ten wpływ ma białko gC oraz kompleks gE/gI. Inną możliwością jest szerzenie się zakażenia bezpośrednio z komórki do komórki. Istotną rolę odgrywają tu kompleks gH/gL oraz glikoproteid B. Modulujący wpływ na efektywność tego procesu mają także gD oraz kompleks gE/gI (29).

Glikoproteidy gE i gI były jednymi z pierwszych, które poddano drobiazgowym badaniom odnośnie ich wpływu na zjadliwość ADV. Glikoproteid gE umożliwia wirusowi wniknięcie do komórek układu nerwowego i szerzenie się zakażenia od neurocytu do neurocytu wzdłuż wypustek osiowych – aksonów. W procesie tym synergistyczne działanie wykazuje glikoproteid gI, tworząc z gE funkcjonalną jednostkę heterodimeryczną (29).

Znajomość powyższych procesów oraz dokładne określenie związków odpowiedzialnych za zjadliwość i neurowirulencję ADV jakimi są enzym TK oraz glikoproteid gE, miało ogromny wpływ na opracowanie nowoczesnych szczepionek przeciw chA. Posługując się metodami inżynierii genetycznej usunięto z genomu wirusa geny TK oraz gE a powstałe mutanty, przy niezmiennych ich zdolnościach do namnażania się *in vitro* jako szczepionki, tzw. delecyjne. Wprowadzenie tych szczepów do praktyki pozwala na odróżnienie świń uodpornianych od zakażonych wirusem terenowym, umożliwiając eliminację tych ostatnich ze stad szczepionych (vaccina-

tion-eradication), a tym samym uwolnienie ich od chA. Wspomniane szczepy delecyjne, ze względu na zmieniony genotyp, są łatwe do odróżnienia od szczepów dzikich przy pomocy analizy restrykcyjnej, co jest obecnie szczególnie ważne w molekularnych badaniach epidemiologicznych nad chA.

Możliwość wykorzystania analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (restriction fragment length polymorphism – RFLP) DNA wirusa chA w wymienionych wyżej badaniach sugerowano już w pierwszych pracach dotyczących tego zagadnienia (14, 19, 28). Jednocześnie pojawiły się próby klasyfikacji odmiennych genotypowo izolatów ADV. Umożliwiły one określenie 3 podstawowych genotypów wymienionego wirusa (ryc. 2), wśród których wyróżnia się szereg podtypów (6, 7, 21).



Ryc. 2. Schematyczne przedstawienie klasyfikacji szczepów wirusa choroby Aujeszkiego w oparciu o rozdział elektroforetyczny fragmentów restrykcyjnych wirusowego DNA powstałych w wyniku trawienia endonukleazą BamHI (wg 7). Strzałka – kierunek rozdziału elektroforetycznego. Cyfry arabskie – numery kolejnych fragmentów genomu wirusowego DNA w zależności od ich wielkości. Cyfry rzymskie – typ genomu

Możliwości jakie daje analiza restrykcyjna z użyciem sond genetycznych wraz z punktem odniesienia jakim jest klasyfikacja różnych szczepów ADV według typu genomu zostały wykorzystane w modelowych wręcz badaniach epidemiologicznych nad szerzeniem się chA w Danii w latach 1985-1988 (2, 8). Wykazano w nich, że do 1985 r. wszystkie izolowane w tym kraju szczepy terenowe ADV należały do genotypu III, nigdzie indziej nie notowanego. W trakcie kolejno po sobie występujących, początkowo na południu i szerzących się następnie w kierunku północnym tego kraju, epizootii chA w latach 1986/87 i 1987/88, typ III uległ zanikowi a pojawił się typ II, dominujący na terytorium Niemiec w pobliżu granicy z Danią (1, 6).

O zanikaniu starych i pojawianiu się nowych typów genomu ADV donoszono również z Francji (21). Stwierdzono mianowicie, że izolowane w latach 1980-81 na pewnym obszarze szczepy wirusa chA należały do typu I, który wyparty został przez typ II. Badania izolatów z 1986 r. wykazały ponowne pojawienie się typu I co tłumaczy się wprowadzeniem na teren Francji nowych szczepów ADV (21). Do tego samego standardu klasyfikacyjnego, tzn.

typu I, zaliczono także izolaty terenowe wirusa chA wyosobnione w USA i Nowej Zelandii (30) oraz w Holandii, Belgii (na pewnych terenach), Wielkiej Brytanii, Północnej Irlandii, Niemczech (na pewnym terenie), Szwecji i Polsce (10, 15, 19, 20, 26).

Cytowani autorzy zwracają uwagę na typową dla szczepów dzikich (15, 35) różnorodność analizowanych izolatów terenowych w obrębie danego genotypu wirusa chA. Zjawisko to może być skutkiem intensywnego obrotu trzodą chlewną między fermami i związanym z tym wielokrotnym pasażowaniem wymienionego zarazka (3). Znany jest jednak również fakt ograniczonego terytorialnie, endemicznego występowania jednego, szczególnego wariantu genotypowego ADV. Na zjawisko to zwróciła uwagę Kochan i wsp. (26). Wykazała ona, że 7 z 17 badanych krajowych izolatów wirusa chA charakteryzuje się zbliżonym do siebie profilem restrykcyjnym, różniącym się znacznie od pozostałych 10 szczepów terenowych. Na podstawie wywiadu epidemiologicznego ustalono, że unikalne izolaty ADV wyosobniono od świń z ferm zlokalizowanych obszarowo na niewielkim terenie należącym do dwu sąsiednich województw (26). O podobnych obserwacjach donosili także Lomniczi i wsp. (27). W jednym z regionów Węgier izolowano mianowicie szczepy o charakterystycznym, różniącym się jednak istotnie od wirusa prototypowego, genotypie, nie stwierdzanym nigdzie indziej poza tym obszarem. Wymienieni autorzy dokonali również porównania budowy genomu szczepów izolowanych na przestrzeni 10 lat. Uzyskane wyniki pozwoliły na wyróżnienie „starego” i „nowego” typu genomu wśród badanych izolatów. Podobna, wykonana przez Kochan i wsp. (26), porównawcza analiza restrykcyjna polskich szczepów terenowych wirusa chA wykazała niewielkie różnice w budowie genomu pomiędzy izolatami z roku 1974 czy 1977 a wyosobnionymi w 1991 r. Zbliżone do powyższych badania wykonali w Hiszpanii Espuna i wsp. (12). Analizując profile restrykcyjne 50 wyizolowanych od świń szczepów ADV wykazali oni, podobnie jak Lomniczi i wsp. (27), znaczną różnorodność w budowie ich genomów, odbiegającą istotnie od prototypowego – „starego” szczepu wirusa chA. Ponadto autorzy ci wykazali, że 3 spośród 50 analizowanych szczepów stanowiło mieszaninę dwu różnych wariantów genotypowych ADV (12). Na możliwość izolacji od jednej świni mieszaniny dwu różnych, dzikich szczepów wirusa chA oraz dzikiego i szczepionkowego jednocześnie, wskazywali m.in. również Christensen i wsp. (9), Gielkens i wsp. (15), Ficińska (13) oraz Kochan i wsp. (26).

Efekty zastosowania analizy restrykcyjnej w badaniach epidemiologicznych nad ustaleniem tożsamości szczepów ADV izolowanych od innych niż trzoda chlewna gatunków zwierząt przedstawił Hepner (19). Poszukując związków między zachorowa-

niami na chA psów, kotów i bydła na określonym terenie lub w konkretnych gospodarstwach stwierdził ścisłą korelację między tymi przypadkami a występowaniem choroby u trzody chlewnej. Autor ten udowodnił, na podstawie analizy restrykcyjnej, że wyosobnione od wymienionych zwierząt szczepy ADV są identyczne z wyizolowanymi od świń (19). Również w polskich badaniach (26) wykazano, że profile restrykcyjne szczepów ADV izolowanych od lisów hodowlanych (16), nie różnią się istotnie od referencyjnego szczepu NIA-3. Dowodzi to, że zwierzęta te uległy infekcji drogą skarmiania surowych odpadów poubojowych od świń zakażonych zjadliwym wirusem chA. Podobne badania porównawcze nad izolatami pochodzącymi od tuczników i bydła opasowego utrzymywanych w tym samym budynku wykonali Erickson i wsp. (11). Wykazali oni, metodą analizy restrykcyjnej, że szczep wyosobniony od padłego wśród typowych objawów chA bukata jest identyczny z wyizolowanym od zdrowej lecz podejrzanej o bezobjawowe zakażenie świni, u której siewstwo wirusa wywołano w kontrolowanych warunkach na drodze immunosupresji. Cytowani autorzy określili również tożsamość izolatu ADV uzyskanego od innego bukata pochodzącego z tej samej grupy zwierząt ale poddanych profilaktycznemu uodpornianiu szczepionką zawierającą atenuowany szczep BUK, u części których zabieg ten spowodował zejścia śmiertelne z charakterystycznym obrazem klinicznym chA. Analiza restrykcyjna szczepu wyizolowanego i szczepionkowego BUK wykazała ich identyczność. Uznano więc, że przyczyną śmierci wymienionego zwierzęcia był atenuowany szczep szczepionkowy BUK a nie jak podejrzewano, zjadliwy ADV pochodzący od zakażonych bezobjawowo świń (11). Podobny przypadek izolacji atenuowanego szczepu szczepionkowego BUK-TK 650 od padłego na chA cielęcia opisali Espuna i wsp. (12). W ustaleniu tożsamości tego izolatu wykorzystano porównawczą analizę restrykcyjną z oryginalnym wirusem szczepionkowym. Cytowani autorzy hiszpańscy wykryli ponadto, pośród 50 wyosobnionych od świń izolatów ADV, dwa niezwykle interesujące szczepy. Dokładna analiza restrykcyjna pozwoliła na stwierdzenie, iż są one, powstałymi w warunkach naturalnych, spontanicznymi rekombinantami dwu różnych szczepów terenowych wirusa chA (12). Obecność rekombinantów wśród analizowanych 5 węgierskich i 7 polskich (6 od świń i 1 od lisów hodowlanych) terenowych izolatów ADV stwierdzili Christensen i wsp. (5). Wykazali oni, że wśród węgierskich szczepów 3 są rekombinantami ze szczepionkowym wirusem Bartha K-61, natomiast wśród 6 polskich, uzyskanych od świń, 5 wydaje się być pochodnymi szczepionkowego szczepu TK 900 (5). Wyniki dotyczące polskich szczepów wirusa chA, zostały częściowo potwierdzone w bardziej szczegółowych badaniach

wykonanych przez Ficińską (13) oraz Kochan i wsp. (26). Wspomniane autorki przeprowadziły dokładną analizę restrykcyjną 17 krajowych izolatów ADV pochodzących w 13 przypadkach od świń, w tym także badanych przez Christensena i wsp. (5), w trzech od lisów hodowlanych oraz w jednym od psa. Wykazano, że oprócz kilku, wyosobnionych od świń szczepów charakteryzujących się do pewnego stopnia podobieństwem w budowie genomu do szczepionkowego atenuowanego wirusa TK 900, również jeden z izolatów uzyskanych od lisów hodowlanych posiada bardzo zbliżony do niego wzór restrykcyjny (26).

Cytowane wyniki badań autorów duńskich (5), hiszpańskich (12) i polskich (13, 26), wskazujące na obecność powstałych w naturalny – spontaniczny sposób rekombinantów ADV, potwierdziły, dzięki analizie restrykcyjnej, wysuwane w tym zakresie sugestie. Rezultaty prac, w których analizowano terenowe, dzikie izolaty wirusa chA, uzupełnione zostały przez Henderson i wsp. (17, 18) oraz Katza i wsp. (22, 23). Badacze ci wykonali szereg doświadczeń, w ściśle kontrolowanych warunkach *in vitro* oraz *in vivo*, wykazując, przy pomocy analizy restrykcyjnej, możliwość rekombinacji między różnymi wirusami szczepionkowymi, w tym tradycyjnymi – atenuowanymi i delecyjnymi. Powstałe rekombinanty, z których część posiada odtworzone cechy zjadliwości, prowadzić mogą, ze względu na budowę swego genomu, do istotnych epidemiologicznie trudności diagnostycznych oraz kłopotów w interpretacji wyników różnicowych badań serologicznych świń w kierunku chA (24, 25).

Reasumując, należy stwierdzić, że analiza restrykcyjna jest niezwykle przydatną metodą w badaniach epidemiologicznych nad chorobą Aujeszkyego. Pozwala ona bowiem nie tylko na ustalenie dróg szerzenia się choroby oraz źródeł zakażenia i to zarówno w odniesieniu do trzody chlewnej jak i innych gatunków zwierząt ale także, co jest szczególnie cenne z epidemiologicznego punktu widzenia, na określenie tożsamości wyosobnionych izolatów poprzez ich porównanie z innymi szczepami ADV (referencyjnymi, terenowymi, szczepionkowymi). Wymienione zalety analizy restrykcyjnej stanowią więc o wyjątkowej przydatności tej metody w zwalczaniu choroby Aujeszkyego, zwłaszcza w oparciu o programy typu „szczepienie – eliminacja” (vaccination – eradication) przy użyciu szczepionek delecyjnych (33).

#### Piśmiennictwo

1. Andersen J. B.: Proc. 1st Int. Symp. The Eradication of Pseudorabies (Aujeszky's) Virus. St. Paul, Minnesota, USA, 1991, s. 113.
2. Andersen J. B., Bitsch V., Christensen L. S., Hoff-Joergensen R., Kirkegaard Petersen B.: The control and eradication of Aujeszky's disease in Denmark: Epidemiological aspects, w: Vaccination and Control of Aujeszky's Disease, red. J. T. van Oirschot, Kluwer Academic Publ., Dordrecht, 1989.
3. Beran G. W.: Proc. 1st Int. Symp. The Eradication of Pseudorabies (Aujeszky's) Virus. St. Paul, Minnesota, USA, 1991, s. 93.
4. Brown F.: Intervirology 30, 181, 1989.
5. Christensen L. S., Medveczky I., Strandbygaard B. S., Pejsek Z.: Arch. Virol. 124, 225, 1992.
6. Christensen L. S., Mousing J., Mortensen S., Soerensen K. J., Strandbygaard S. B., Henriksen C. A., Andersen J. B.: Vet. Rec. 127, 471, 1990.
7. Christensen L. S., Soerensen K. J.: Arch. Virol. 100, 109, 1988.
8. Christensen L. S., Soerensen K. J.: Vet. Microbiol. 26, 1, 1991.
9. Christensen L. S., Soerensen K. J., Lei J. C.: Arch. Virol. 97, 215, 1987.
10. Christensen L. S., Soerensen K. J., Lei J. C.: Proc. IPVS Congr., Rio de Janeiro, Brazylia, 1988, s. 176.
11. Erickson G. A., White R. C., Schnurrenberger L. W., Slife L. N., Kuhns B. S.: Abstr. Int. Symp. Vet. Lab. Diagn., Amsterdam, Holandia, 1986, s. 22.
12. Espuna E., Kovacs F., Kukedi A., Hejja I., Riera P., Lomniczi B.: Proc. 1st Int. Symp. The Eradication of Pseudorabies (Aujeszky's) Virus. St. Paul, Minnesota, USA, 1991, s. 65.
13. Ficińska J.: Analiza porównawcza wybranych szczepów terenowych wirusa choroby Aujeszkyego metodą hybrydyzacji. Praca mag., Uniwersytet Gdański, 1993.
14. Gielkens A. L. J., Berns A. J. M.: Differentiation of Aujeszky's disease virus strains by restriction endonuclease analysis of the viral DNA's, w: Aujeszky's disease, red. G. Wittmann, S. A. Hall, Martinus Nijhoff Publ., The Hague, 1982.
15. Gielkens A. L. J., Oirschot van J. T., Berns A. J. M.: J. gen. Virol. 66, 69, 1985.
16. Górski J., Nowakowska M.: Mat. XVIII Zjazdu PTM, Lublin, 1975, s. 337.
17. Henderson L. M., Katz J. B., Erickson G. A., Mayfield J. E.: Am. J. Vet. Res. 51, 1656, 1990.
18. Henderson L. M., Levings R. L., Davies A. J., Sturtz D. R.: Am. J. Vet. Res. 52, 820, 1991.
19. Heppner B.: Stammdifferenzierung von Pseudorabies Viren mit Hilfe der Restriktionsenzymanalyse von DNA: Eine Studie zur Epizootiologie der Aujeszky'schen Krankheit. Praca dokt., Freien Universitat Berlin, 1983.
20. Herrmann S. C., Heppner B., Ludwig H.: Pseudorabies viruses from clinical outbreaks and latent infections grouped into four major genome types, w: Latent herpes virus infections in veterinary medicine, red. G. Wittmann, R. M., Gaskell, H.-J. Rziha, Martinus Nijhoff Publ., The Hague, 1984.
21. Jestin A., Blanchard P., Garbar-Chenon A., Vannier P., Nicolas J. C.: Arch. Virol. 112, 149, 1990.
22. Katz J. B., Henderson L. M., Erickson G. A.: Vaccine 8, 286, 1990.
23. Katz J. B., Henderson L. M., Erickson G. A., Osorio F. A.: J. Vet. Diagn. Invest. 2, 135, 1990.
24. Katz J. B., Pedersen J. C.: Biologicals, 20, 187, 1992.
25. Katz J. B., Pedersen J. C.: Am. J. Vet. Res. 53, 2259, 1992.
26. Kochan G., Lipowski A., Ficińska J., Szewczyk B.: Acta vet. hung. 42, 369, 1994.
27. Lomniczi B., Nagy E., Kukedi A., Zsak L.: Molecular epidemiology of Aujeszky's disease in Hungary, w: Vaccination and Control of Aujeszky's Disease, red. J. T. van Oirschot, Kluwer Academic. Publ., Dordrecht, 1989.
28. Ludwig H., Heppner B., Herrmann S.: The genomes of different field isolates of Aujeszky's disease virus, w: Aujeszky's disease, red. G. Wittmann, S. A. Hall, Martinus Nijhoff Publ., The Hague, 1982.
29. Mettenleiter T. C.: Acta vet. hung. 42, 153, 1994.
30. Oliver R. E.: Aust. vet. J. 66, 432, 1989.
31. Paul P. S., Mengeling W. L., Pirtle E. C.: Arch. Virol. 73, 193, 1982.
32. Pirtle E. C., Wathen M. W., Paul P. S., Mengeling W. L., Sacks J. M.: Am. J. Vet. Res. 45, 1906, 1984.
33. Szweda W.: Badania nad zastosowaniem różnych metod zapobiegania i zwalczania choroby Aujeszkyego u trzody chlewnej. Praca hab., ART Olsztyn, 1992.
34. Van Oirschot J. T.: Proc. 1st Int. Symp. The Eradication of Pseudorabies (Aujeszky's) Virus. St. Paul, Minnesota, USA, 1991, s. 85.
35. Wathen M. W., Pirtle E. C.: J. gen. Virol. 65, 1401, 1984.

Adres autora: dr Andrzej Lipowski, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy