

Pokrewieństwo szorstkich szczepów *Salmonella* z reprezentantami niektórych serowarów stwierdzanych u zwierząt

ANDRZEJ HOSZOWSKI, ANNA LALAK, MAGDALENA ZAJĄC, ILONA SAMCIK, MAGDALENA SKARŻYŃSKA, DANUTA WNUK, DARIUSZ WASYL

Zakład Mikrobiologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Hoszowski A., Lalak A., Zajac M., Samcik I., Skarzyńska M., Wnuk D., Wasyl D.

Relationships of rough *Salmonella* strains with representatives of some serovars found in animals

Summary

The objective of this study was to provide an epidemiological characterisation of rough *Salmonella* strains and to evaluate their genetic relationship with some representatives of serovars noted in animals. Genome macrorestriction by means of pulsed field gel electrophoresis of 57 rough strains revealed 8 groups showing high genetic similarity to the profiles observed in *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Mbandaka, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Goldcoast, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Oranienburg and *Salmonella* Derby. Some of them showed profiles indistinguishable from the representatives of the above-mentioned serovars. These included also the most numerous group of “*Salmonella* Enteritidis-like” strains. This proves epidemiologic relationships within this group as well as with the reference strains, representing serovars found in animals. It was concluded that the molecular typing of rough strains provides additional epidemiological information and could sufficiently support routine *Salmonella* diagnostics, including autoagglutinating isolates.

Keywords: PFGE, *Salmonella* diagnostics, autoagglutination, rough strains

Rutynowa diagnostyka *Salmonella* obejmuje identyfikację struktury antygenowej szczepów zgodnie ze schematem White-Kauffmann-LeMinor (11). W badaniach epidemiologicznych niezbędne jest dysponowanie danymi umożliwiającymi dalsze różnicowanie szczepów w obrębie serowaru. Do tego celu wykorzystywanych jest szereg metod fenotypowych i genotypowych, takich jak np.: analiza restrykcyjna genomu z zastosowaniem elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (PFGE), PCR, MLST czy MLVA (2-5, 7, 9, 12).

Ochrona zdrowia konsumentów jest jednym z priorytetów polityki realizowanej przez Unię Europejską (7). Ze względu na wysoką liczbę przypadków salmonellozy u ludzi, we wszystkich krajach członkowskich wdrożono programy zwalczania *Salmonella* w stadach kur i indyków. Ich celem jest ograniczenie częstości występowania serowarów *Salmonella* istotnych w epidemiologii zakażeń człowieka, takich jak: *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Infantis i *Salmonella* Virchow. Badania laboratoryjne, niezbędne przy realizacji tych

programów, są wykonywane znormalizowaną (18) metodą obejmującą izolację i identyfikację serologiczną pałeczek *Salmonella*. Niekiedy natrafia się na trudności diagnostyczne wynikające z występowania szczepów o nietypowej strukturze antygenowej, nie posiadających faz rzęskowych, ze słabą ekspresją rząsek czy też cechujących się właściwościami autoaglutynacyjnymi (szczepy „szorstkie”, „R”, posiadające w ścianie komórkowej cząsteczki lipopolisacharydowe pozabawione łańcucha O-swoistego) (1, 3, 9, 10, 13, 16, 17). Błędne rozpoznanie struktur antygenowych szczepów może skutkować ograniczeniem efektywności programów zwalczania *Salmonella* w krajach Wspólnoty Europejskiej (7). Dodatkowo, ocena sytuacji epidemiologicznej przeprowadzona w oparciu o tak uzyskane wyniki, może odbiegać od sytuacji rzeczywistej.

Celem prezentowanych badań była charakterystyka epidemiologiczna szorstkich szczepów *Salmonella* oraz określenie ich pokrewieństwa genetycznego ze szczepami reprezentującymi serowary stwierdzane u zwierząt.

Materiały i metody

Szczepy bakteryjne. Przedmiotem badań było 57 autoaglutynujących szczepów *Salmonella* wyizolowanych w latach 2007-2010 od kur reprodukcyjnych (N = 7), niosek (N = 13), brojlerów (N = 29), kur o nieustalanej użyteczności (N = 1), kaczek (N = 2), środowiska produkcji pasz (N = 2), z pasz (N = 1) i żywności (N = 2). Szczegółowe informacje dotyczące źródła i czasu izolacji szczepów przedstawiono na ryc. 1. Przynależność izolatów do rodzaju *Salmonella* została potwierdzona przy użyciu opisanych wcześniej metod biochemicznych (14), jednak w trakcie identyfikacji serologicznej wykonywanej metodą aglutynacji szkiełkowej, zgodnie ze schematem White-Kauffmann-Le Minor (11), wykazywały one właściwości autoaglutynacyjne pomimo wielokrotnych pasażów przez np. pożywki płynne (bulion wg Rappaport-Vassiliadis z soją – RVS, bulion mózgowo-sercowy – BHI) bądź przez zmodyfikowaną półpłynną pożywkę Rappaport-Vassiliadis (MSRV) (1).

Elektroforeza w pulsacyjnym polu elektrycznym. Do zróżnicowania szczepów zastosowano analizę restrykcyjną genomu z zastosowaniem elektroforezy w pulsacyjnym polu elektrycznym (PFGE – Pulse field gel electrophoresis). Przygotowanie DNA bakteryjnego, rozdział elektroforetyczny (CHEF DRIL, Bio-Rad) i analizę obrazu żelu (BioNumerics, Applied Maths) wykonano zgodnie z zaleceniami PulseNet Europe (20). Trawienie DNA przy użyciu 20U enzymu restrykcyjnego XbaI (Fermentas) prowadzono przez 4 godz. w temperaturze 37°C. Żel agarozowy barwiony w roztworze bromku etydyny wizualizowano w świetle UV i archiwizowano przy użyciu systemu dokumentacji żeli (EC3110, UVP LLC BioImaging Systems).

Do porównania profili DNA zastosowano współczynnik Dice. Dendrogram generowano z zastosowaniem metody UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) przy 1,5% optymalizacji i 0,5% tolerancji położenia prążka. Stwierdzone profile genomowego DNA szczepów szorstkich porównano z zasobami własnej bazy danych zawierającej profile około 900 szczepów *Salmonella*. W niniejszym opracowaniu uzyskiwane wyniki porównano z 11 profilami charakterystycznymi dla szczepów odniesienia zaklasyfikowanych do 8 serowarów *Salmonella*: Enteritidis, Mbandaka, Typhimurium, Goldcoast, Infantis, Hadar, Oranienburg i Derby.

Wyniki i omówienie

Wśród badanych szczepów *Salmonella* stwierdzono 20 profili makrorestrykcyjnych genomowego DNA (ryc. 1), z których 14 obserwowano u pojedynczych szczepów. Dwa profile były reprezentowane przez 2 szczepy, natomiast pozostałe 4 obserwowano u 4, 5, 6 i 24 izolatów. Pokrewieństwo genetyczne badanych szczepów wyniosło 51%.

Z dostępnego piśmiennictwa wynika, że większość szczepów reprezentujących ten sam serowar *Salmonella* i występujących w tym samym czasie i regionie geograficznym cechuje wysoki stopień pokrewieństwa (4, 8, 10, 13, 17). Analiza uzyskanych wyników sugeruje, że badane szczepy *Salmonella* najprawdopodobniej wywodzą się z kilku serowarów. Na podstawie przyjętego *a priori* kryterium pokrewieństwa genetycznego wynoszącego 80%, badane szczepy zakwalifi-

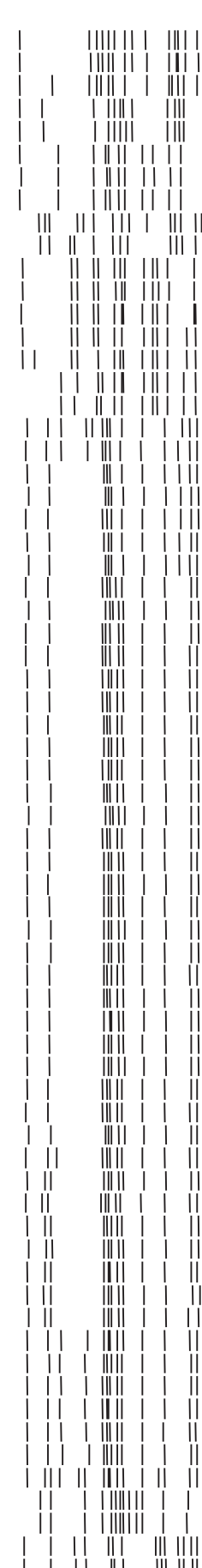
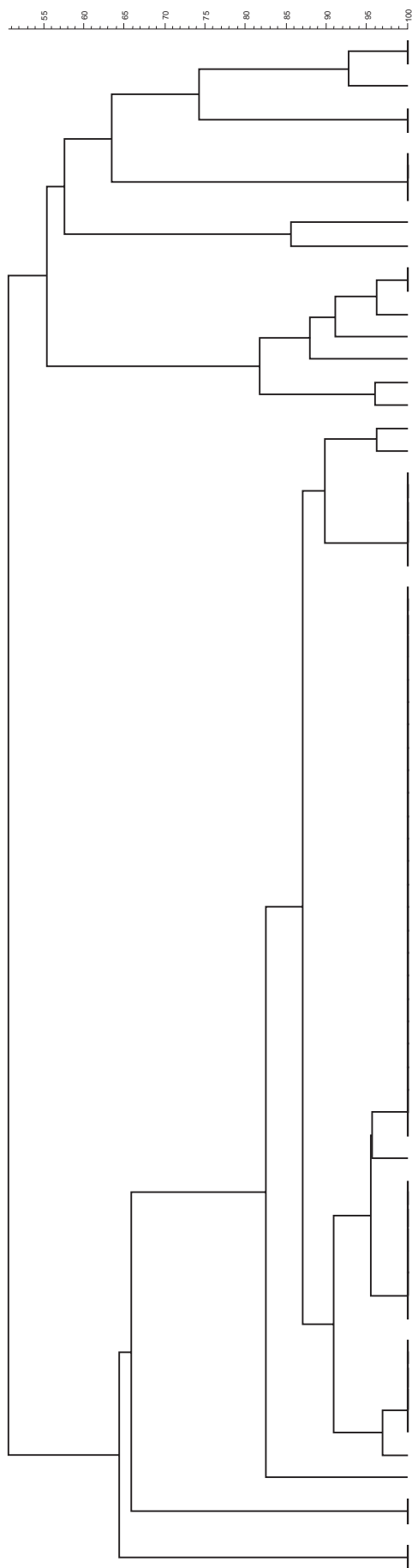
kowano do 8 grup obejmujących profile makrorestrykcyjne identyczne lub zbliżone do tych stwierdzanych u szczepów odniesienia: *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Mbandaka, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Goldcoast, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Oranienburg i *Salmonella* Derby. Przyjęte kryterium oceny pokrewieństwa genetycznego szczepów zgodne z zasadami analizy wzorów elektroforetycznych opisanymi przez Tenover i wsp. (19) zakłada, że różnica profili elektroforetycznych obejmująca do 6 fragmentów DNA chromosomalnego może być efektem dwóch zdarzeń genetycznych (np. mutacja, delecja, insercja) i świadczy o potencjalnym pokrewieństwie szczepów.

Czterdzieści z 57 badanych izolatów charakteryzowało się profilem identycznym z obserwowanym u jednego ze szczepów odniesienia. Najlicniejsza grupa badanych szczepów szorstkich charakteryzowała się profilami makrorestrykcyjnymi odpowiadającymi zgromadzonym w bazie profilom *Salmonella* Enteritidis. W obrębie tej grupy wyodrębniono 9 profili, z których najlicniejszy był reprezentowany przez 24 szczepy wyosobnione od kur (N = 22) i kaczek (N = 2) w latach 2007-2010. Wykazywały one 100% pokrewieństwo genetyczne ze szczepem *Salmonella* Enteritidis N192A uzyskanym ze stada kur niosek w 2005 r. Kolejna grupa 6 szczepów wyizolowanych ze stad kur reprodukcyjnych (N = 1), niosek (N = 2) i brojlerów (N = 3) wykazała profil nierozróżnialny z *Salmonella* Enteritidis N390B izolowanym w 2005 r. od kur niosek. Analogicznie, 4 kolejne izolaty pochodzące ze stada reprodukcyjnego kur i stad brojlerów (N = 3) charakteryzowały się również identycznym profilem z *Salmonella* Enteritidis N316D (kury nioski, 2005 r.). Stopień podobieństwa obu wymienionych wcześniej profili z najliczniej reprezentowanym wzorcem sięgnął, odpowiednio, 95% i 90%, co świadczy o wysokim pokrewieństwie genetycznym (19). W związku z faktem, że w każdej z grup szczepów szorstkich o nierozróżnialnym profilu charakterystycznym dla *Salmonella* Enteritidis obserwowano izolaty pochodzące ze stad reprodukcyjnych, udowodniona wydaje się rola pionowej transmisji zakażenia do stad kur niosek i brojlerów. Ogółem do grup wykazujących podobieństwa do profili *Salmonella* Enteritidis należało 44 z 57 (77,2%) badanych szczepów. Stopień pokrewieństwa przekraczający w większości przypadków 85% wskazuje na istnienie silnych związków epidemiologicznych pomiędzy tymi szczepami i uzasadnia stosowanie w odniesieniu do nich terminu „podobne do *Salmonella* Enteritidis”. Analogiczne podejście prezentowali inni autorzy, kwalifikując atypowe formy *Salmonella* do określonych serowarów, pomimo braku ekspresji pełnej struktury antygenowej (6, 7, 9, 10).

Dwa szczepy charakteryzowały się 100% i 93% pokrewieństwem genetycznym ze szczepem *Salmonella* Infantis N026A (kury nioski, 2005 r.). Trzy kolejne szczepy wykazywały identyczne profile genetyczne ze

Dica (Opt:0.50%) (Tol:1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
PFGE-Xbal

PFGE-Xbal



nr szczepu	data	serowar	źródło izolacji	kierunek produkcji
2457/2009	2009	R	kura	stado brojlerów
N026A	2004	Infantis	kura	stado niosek
1252/2009	2009	R	kura	stado brojlerów
2109/2009	2009	R	kura	stado brojlerów
433/2003	2010	Hadar	człowiek	
1164/2008	2008	R	pasza	
1641/2008	2008	Goldcoast	gęś	stado rzeźne
1723/2009	2009	R	kura	stado niosek
1748/2008	2008	R	żywność	
DK-U292	2008	Typhimurium	człowiek	
0453/2010	2010	R	kura	stado brojlerów
0464/2010	2010	R	kura	stado brojlerów
0449/2010	2010	Mbandaka	kura	stado niosek
0841/2010	2010	R	pasza	
0837/2010	2010	R	pasza	
0521/2010	2010	Mbandaka	kura	stado niosek
0523/2010	2010	R	kura	stado brojlerów
1169/2009	2009	R	kura	stado niosek
2459/2009	2009	R	kura	stado brojlerów
0111/2009	2009	R	kura	stado brojlerów
0461/2010	2010	R	kura	stado brojlerów
0944/2007	2007	R	kura	stado reprodukcyjne
2442/2009	2009	R	kura	stado brojlerów
N316D	2005	Enteritidis	kura	stado niosek
0043/2010	2010	R	kura	stado brojlerów
0125/2007	2007	R	kura	stado reprodukcyjne
0197/2010	2010	R	kura	stado brojlerów
0225/2010	2010	R	kura	
0259/2010	2010	R	kaczka	
0261/2010	2010	R	kaczka	
0279/2010	2010	R	kura	stado brojlerów
0280/2010	2010	R	kura	stado brojlerów
0397/2009	2009	R	kura	stado niosek
0457/2010	2010	R	kura	stado brojlerów
0470/2010	2010	R	kura	stado brojlerów
0529/2010	2010	R	kura	stado brojlerów
0545/2010	2010	R	kura	stado brojlerów
0547/2010	2010	R	kura	stado niosek
0549/2010	2010	R	kura	stado brojlerów
0604/2010	2010	R	kura	stado brojlerów
0619/2010	2010	R	kura	stado brojlerów
1191/2008	2008	R	kura	stado reprodukcyjne
1199/2009	2009	R	kura	stado niosek
1203/2008	2008	R	kura	stado reprodukcyjne
1454/2008	2008	R	kura	stado niosek
1666/2008	2008	R	kura	stado brojlerów
1950/2007	2007	R	kura	stado reprodukcyjne
2160/2009	2009	R	kura	stado brojlerów
N192A	2005	Enteritidis	kura	stado niosek
1111/2009	2009	R	kura	stado niosek
0112/2009	2009	R	kura	stado brojlerów
0394/2009	2009	R	kura	stado niosek
0450/2010	2010	R	kura	stado brojlerów
0631/2010	2010	R	kura	stado brojlerów
0639/2010	2010	R	kura	stado reprodukcyjne
1141/2008	2008	R	kura	stado niosek
N390B	2005	Enteritidis	kura	stado niosek
1164/2009	2009	R	kura	stado niosek
1288/2009	2009	R	pasza	
1500/2009	2009	R	kura	stado brojlerów
2029/2009	2009	R	kura	stado brojlerów
2035/2009	2009	R	kura	stado niosek
2036/2009	2009	R	kura	stado niosek
1188/2009	2009	R	kura	stado niosek
1552/2008	2008	R	żywność	
1554/2008	2008	Derby	żywność	
0462/2010	2010	R	kura	stado niosek
1042/2010	2010	Oranienburg	kura	stado niosek

Ryc. 1. Pokrewieństwo genetyczne autoaglutynujących (R) szczepów *Salmonella*

szczepami, odpowiednio, *Salmonella* Oranienburg, *Salmonella* Derby i *Salmonella* Hadar. Stwierdzenie szczepu „podobnego do *Salmonella* Hadar” o profilu nierozróżnialnym z izolatem uzyskanym od człowieka wskazuje na potencjalne zagrożenie dla zdrowia publicznego ze strony szczepów szorstkich.

Nieco inaczej przedstawia się sytuacja w przypadku grupy 6 szczepów, dla których w bazie nie stwierdzono odpowiadających im profili. Pięć z nich wykazywało co najmniej 82% podobieństwo z profilami *Salmonella* Mbandaka, a szósty – 86% w odniesieniu do *Salmonella* Typhimurium. Co ciekawe, szczep „podobny do *Salmonella* Typhimurium” wykazywał najwyższe pokrewieństwo ze szczepem odpowiedzialnym za szereg zakażeń ludzi w Danii, którego pierwotnie trudne do identyfikacji źródło zakażenia (8) udało się zidentyfikować dzięki badaniom prowadzonym równoległe w Danii, Norwegii i Szwecji. Wskazały one wymianę handlową jako kluczową przyczynę szerzenia się zakażenia u ludzi (4).

Intensywna wymiana handlowa może być też przyczyną pojawienia się zarówno szczepów szorstkich, jak i „egzotycznych” serowarów *Salmonella*, takich jak *Salmonella* Goldcoast, którego występowanie się u zwierząt w Polsce obserwuje się od 2008 r. W prezentowanych badaniach stwierdzono 2 szczepy szorstkie, które charakteryzowały się profilem identycznym z należącym do tego serowaru szczepem 1641/2008. Na podkreślenie zasługuje fakt, że jeden z nich został wyizolowany z paszy, co może wskazywać na rolę tego elementu łańcucha żywieniowego w szerzeniu się zakażeń wywołanych przez szorstkie szczepy *Salmonella*.

Wzrost częstotliwości występowania szczepów szorstkich, odnotowany u zwierząt w ostatnim okresie na terenie Polski (obserwacje własne), może być spowodowany oddziaływaniem na komórki *Salmonella* antybiotyków, środków dezynfekujących czy czynników środowiskowych (1, 3, 16). Zwalczenie niektórych serowarów *Salmonella* u drobiu, prowadzone od kilku lat na terenie Wspólnoty, połączone z zabiegami dezynfekcyjnymi prowadzonymi na terenie ferm, może wpłynąć na wzrost częstości występowania szczepów szorstkich oraz serowarów dotychczas rzadko notowanych. Utrzymywanie się przez kilka lat zakażeń drobiu szczepami szorstkimi „podobnymi do” określonych serowarów wskazuje na znaczenie epidemiologiczne tego zjawiska. Z piśmiennictwa wynika, że w przewodzie pokarmowym zwierząt może dojść do odtworzenia struktury antygenowej charakterystycznej dla gładkich szczepów *Salmonella* (4). Dlatego nie należy wykluczać możliwości rewersji właściwości patogennych u szorstkich szczepów *Salmonella* i wywołania przez nie zachorowań zwierząt i ludzi (16).

Przedstawione wyniki świadczą o potrzebie i możliwości zastosowania metod molekularnych w uzupełnieniu rutynowej diagnostyki *Salmonella*. PFGE umożliwiła bowiem zakwalifikowanie wszystkich badanych

szczepów do grup o wysokim podobieństwie z profilami DNA stwierdzanymi u serowarów występujących u zwierząt. W świetle dostępnych informacji wydaje się, że technika serologicznego oznaczania *Salmonella* jest coraz częściej wspierana metodami genotypowymi (3, 7, 9, 10, 15).

Piśmiennictwo

1. Anon.: The development and evaluation of improved methods for serotyping rough strains of *Salmonella*. Report carried out by Bacteriology Discipline, CVL, Addlestone 2007.
2. Baggesen D. L., Sorensen G., Nielsen E. M., Wegener H. C.: Phage typing of *Salmonella* Typhimurium – is it still a useful tool for surveillance and outbreak investigation? *Euro Surveill.* 2010, 15(4):pii=19471. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19471>.
3. Baudart J., Lemarchand K., Brisabois A., Lebaron P.: Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 1544-1552.
4. Bruun T., Sorensen G., Forshell L. P., Jensen T., Nygard K., Kapperud G., Lindstedt B. A., Berglund T., Wingstrand A., Petersen R. F., Muller L., Kjelso C., Ivarsson S., Hjertqvist M., Lofdahl S., Ethelberg S.: An outbreak of *Salmonella* Typhimurium infections in Denmark, Norway and Sweden, 2008. *Euro Surveill.* 2009, 14(10):pii=19147. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19147>.
5. Dlabac V., Trebichavsky I., Rehakova Z., Hofmanova B., Splichal I., Cukrowska B.: Pathogenicity and protective effect of rough mutants of *Salmonella* species in germ-free piglets. *Infect. Immun.* 1997, 65, 5238-5243.
6. Echeita M. A., Herrera S., Usera M. A.: Atypical, fljB -negative *Salmonella* enterica subsp. enterica strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, 2981-2983.
7. EFSA Panel on biological Hazards (BIOHAZ): Scientific opinion on monitoring and assessment of public health risk of „*Salmonella* Typhimurium-like” strains. *The EFSA Journal* 2010, 8, 1826 [48 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2010.1826. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm.
8. Ethelberg S., Wingstrand A., Jensen T., Sorensen G., Muller L., Nielsen E. M., Molbak K.: Large ongoing outbreak of infection with *Salmonella* Typhimurium U292 in Denmark, February–July 2008. *Euro Surveill.* 2008, 13(28):pii=18923. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18923>.
9. Fitzgerald C., Collins M., van Duyne S., Mikoleit M., Brown T., Fields P.: Multiplex, bead-based suspension array for molecular determination of common *Salmonella* serogroups. *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45, 3323-3334.
10. Garaizar J., Porwollik S., Echeita A., Rementeria A., Herrera S., Wong R. M., Frye J., Usera M. A., McClelland M.: DNA microarray-based typing of an atypical monophasic *Salmonella* enterica serovar. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40, 2074-2078.
11. Grimont P. A. D., Weill F.-X.: Antigenic formulas of *Salmonella* serovars, 9th edition. WHO Collaborating Centre for Research on *Salmonella*, Institute Pasteur, 75724 Paris Cedex 15, France 2007.
12. Hoorfar J., Baggesen D. L., Porting P. H.: A PCR-based strategy for simple and rapid identification of rough presumptive *Salmonella* isolates. *J. Microbiol. Methods* 1999, 35, 77-84.
13. Hopkins K. L., Kirchner M., Guerra B., Granier S. A., Lucarelli C., Porrero M. C., Jakubczak A., Threlfall E. J., Mevius D. J.: Multiresistant *Salmonella* enterica serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? *Euro Surveill.* 2010, 15(22):pii=19580. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19580>.
14. Hoszowski A., Truszczyński M.: Skrócona identyfikacja pałeczek *Salmonella* przy zastosowaniu metody czterech probówek. *Medycyna Wet.* 1977, 33, 738-740.
15. Kim S., Frye J. G., Hu J., Fedorka-Cray P. J., Gautom R., Boyle D. S.: Multiplex PCR-based method for identification of common clinical serotypes of *Salmonella* enterica subsp. enterica. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44, 3608-3615.
16. McQuiston J. R., Fields P. I., Tauxe R. V., Logsdon J. M. Jr.: Do *Salmonella* carry spare tyres? *Trends Microbiol.* 2008, 16, 142-148.
17. Petrov P., Hendriksen R. S., Kantardjiev T., Asseva G., Sorensen G., Fields P., Mikoleit M., Whichard J., McQuiston J. R., Torpdahl M., Aarestrup F. M., Angulo F. J.: Occurrence and characterization of *Salmonella* enterica subspecies enterica serovar 9,12:l,v:- strains from Bulgaria, Denmark, and the United States. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2009, 28, 473-479.
18. Polska Norma: PN-EN ISO 6579:2003/A1:2007. Mikrobiologia żywności i pasz – Horzontalna metoda wykrywania *Salmonella* spp.
19. Tenover F. C., Arbeit R. D., Goering R. V., Mickelsen P. A., Murray B. E., Persing D. H., Swaminathan B.: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulse-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 2233-2239.
20. Wasyl D., ElSedawy A., Lukinmaa S.: PulseNet Europe międzynarodowa sieć typowania molekularnego w nadzorze epidemiologicznym chorób szerzających się drogą pokarmową. *Medycyna Wet.* 2008, 64, 123-126.

Adres autora: dr Andrzej Hoszowski, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: ahosz@piwet.pulawy.pl