

## Swine influenza in the light of reports of the International Symposium in Kyoto, 2015

Truszczyński M., Pejsak Z., Department of Swine Diseases, National Veterinary Research Institute, Pulawy

Concluding from the contents of the Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, which took place in Kyoto, Japan, in June 2015, swine influenza was one of the most important swine diseases. There are several reasons for this approach. Despite its low mortality, the disease is characterized by high morbidity with fever, sneezing and coughing, thus it is very contagious. Clinical signs include also stiffness, recumbency and lethargy. It results in decreased growth performance. Even more frequently, the subclinical form of the disease occurs, when decreasing the weight of feed conversion rate is observed. Besides the consequences on swine health and productivity, the type A influenza virus, being the etiological agent of swine influenza, is also an important zoonotic pathogen and pigs are considered as a reservoir and the potential source of novel reassortants, including influenza viruses of pandemic potential for humans. This paper contains information on the variability and evolution of novel subtypes, lineages and clusters of emerging type A influenza virus of swine origin. This review is also presenting data on the methods of laboratory diagnosis and the role of vaccines in the control of swine influenza.

**Keywords:** Kyoto Symposium in 2015, emerging and re-emerging pig diseases, swine influenza.

# Grypa świń w świetle doniesień Międzynarodowego Sympozjum w Kioto, 2015

Marian Truszczyński, Zygmunt Pejsak

z Zakładu Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

Celem artykułu jest przedstawienie tematyki dotyczącej grypy świń (swine influenza – SI), prezentowanej na 7. Międzynarodowym Sympozjum w Kioto, w Japonii, poświęconym nowym i ponownie pojawiającym się groźnym chorobom świń (7<sup>th</sup> International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases).

Wystąpienia na temat grypy świń obejmowały: wykład plenarny zaprezentowany przez Kristien van Reeth (1), omawiający osiągnięcia lat ostatnich, zwłaszcza na temat wirusa grypy oraz szereg doniesień uwzględniających tematykę epidemiologiczną i kliniczną choroby.

Dane dotyczące grypy świń i ptaków oraz człowieka, z uwzględnieniem wirusa grypy, w tym jego klasyfikacji, właściwości antygenowych i genetycznych oraz chorobotwórczości, przedstawione zostały stosunkowo niedawno w piśmiennictwie

polskojęzycznym, obejmującym istotne pozycje zagraniczne (2, 3, 4, 5).

Spośród 3 typów wirusa grypy, należących do rodziny *Orthomyxoviridae* – A, B i C, najważniejszy wydaje się typ A ze względu na szczególne znaczenie w wywoływaniu zachorowań u zwierząt i człowieka, w tym jako zoonoza i przyczyna poważnych strat gospodarczych.

Wirusy typu A charakteryzują się dużym polimorfizmem. Ich genom, będący pojedynczą nicią RNA, otoczony jest kapsydem. Jego wewnętrzna część, tzw. macierz, zbudowana jest z białek, natomiast część zewnętrzną stanowią wypustki glikoproteinowe. Wśród nich rozróżnia się hemaglutyninę (HA) i neuraminidazę (NA) o właściwościach antygenowych i znaczeniu w patogenie oraz epidemiologii. Obecnie znanych jest 16 różniących się swoistością antygenów HA (H1 – H16) i 9 różnych antygenów NA (N1 – N9).

Ich kombinacje określają podtypy wirusa grypy (1).

Istnieją dwa podstawowe mechanizmy szczególnie dużej zmienności genetycznej wirusa grypy: przesunięcie antygenowe i reasortacja fragmentów RNA, czyli skok antygenowy.

Przesunięcie antygenowe (antigenic drift) dotyczy drobnych zmian w segmentach kodujących antygeny powierzchniowe. W wyniku tego powstają, szczególnie często w porównaniu do innych wirusów, mutacje punktowe, prowadzące do pojawiania się w następstwie selekcji nowych wariantów antygenowych.

Reasortacja, czyli skok antygenowy (antigenic shift), może nastąpić, gdy komórka gospodarza zostanie zakażona jednocześnie przez dwa różniące się od siebie podtypy wirusa grypy, przykładowo równoczesne zakażenie komórki zwierzęcej szczepem ludzkim i ptasiem może doprowadzić do powstania nowych podtypów lub wariantów, które mogą stać się czynnikiem etiologicznym dającym początek epidemii, a nawet pandemii (6, 7, 8).

Po tych uwagach wstępnych omówione zostanie wystąpienie van Reeth (1) poświęcone obserwowanej, począwszy od lat 90. ubiegłego wieku, zmienności wirusa grypy świń. Podobne zjawisko wystąpiło też u wirusów grypy innych gatunków zwierząt i człowieka. Powstały nowe podtypy, nowe linie (lineages) i nowe grupy (clusters) wirusa grypy typu A.

Wspomniane glikoproteiny HA i NA po zakażeniu wzbudzają u zakażonego gospodarza swoistych przeciwciał, które są ważne w ograniczaniu zakażenia, jak również w ochronie przed chorobą. Z tego względu nazywane są przeciwciałami neutralizującymi wirus. Glikoproteina HA jest bardziej istotna niż NA, ponieważ ma wpływ na pierwszy etap zakażenia, czyli łączenie się wirusa z receptorami komórek gospodarza. Przeciwciała swoiste dla HA utrudniają, a nawet uniemożliwiają wnikięcie wirusa do komórki gospodarza. Antygeny HA i NA oraz swoiste dla nich przeciwciała w swych różnych kombinacjach określają podtypy wirusa grypy.

Najważniejszymi gospodarzami wirusów grypy typu A są dzikie i udomowione ptaki, człowiek, świnie i konie, chociaż wirus grypy typu A może też zakażać foki, fretki i norki, a rzadziej też koty i psy.

Nieomal wszystkie możliwe powiązania HA i NA z efektem tworzenia podtypów wykazano u dzikiego ptactwa wodnego, a ograniczona liczba podtypów wirusa grypy występuje u poszczególnych gatunków ssaków; świnie wyróżniają się tym, że są nosicielami tych samych podtypów typu A wirusa grypy, jak ludzie, czyli: H1N1, H3N2 i H1N2. Jednak jak

podaje van Reeth (1), wirusy grypy ludzi i świń w ramach podanych podtypów nie są identyczne.

W minionym stuleciu oraz początku XXI wieku miały miejsce cztery pandemie grypy: w 1918 r. (H1N1), 1957 r. (H2N2), w 1968 r. (H3N2) i w 2009 r. (H1N1). W pierwszych trzech pandemiach podtypy wirusa grypy lub przynajmniej ich HA, wywodziły się od wirusów występujących u dzikich ptaków. Natomiast wirus czwartej pandemii pochodzi od wirusów grypy, których głównym gospodarzem jest świnia. Jednakże warunki, które doprowadziły do pojawienia się tych pandemicznych wirusów, nie zostały do końca wyjaśnione. Przykładowo nie jest jasne, czy wirus z 1918 r. najpierw zakaził ludzi czy świnie (1). Podobnie nie jest pewne, czy reasortacja prowadząca do pandemicznych wirusów grypy w 1957 r. i 1968 r. miała miejsce w organizmie świń, gdyż tego nigdy nie potwierdzono. Natomiast oczywiste jest, że zarówno wirus grypy pochodzący od ptaków, jak też wirus grypy świń są patogenami zoonotycznymi, gdyż od czasu do czasu przechodzą od swych naturalnych gospodarzy do ludzi, wywołując u nich zachorowania. Co jednak należy dodatkowo podkreślić to to, że prawie niezmiennie nie przenoszą się one z człowieka na człowieka bez dokonania się dodatkowych zmian. Obecnie wiemy, jak informowała van Reeth (1), że wymagane byłyby liczne genetyczne zmiany, aby wirusy te adaptować do transmisji między ludźmi, ale istota tych zmian pozostaje w dużym stopniu nieznana. Nie wiadomo również, które z wirusów – ptasie czy świńskie – są najbardziej niebezpieczne, w sensie rozprzestrzeniania się wśród ludzi. Jakkolwiek by było, wirusy grypy świń są filogenetycznie bardziej bliskie wirusom grypy ludzi niż wirusy grypy ptaków. Być może, jak sądzi van Reeth (1), mogłoby to wskazywać, że wirusy grypy świń są bardziej niebezpieczne w sensie przekraczania granicy gatunkowej do ludzi niż wirusy grypy ptasiej.

U ludzi, jak podaje van Reeth (1), dwa różniące się podtypy typu A – H3N2 i H1N1 krążą przede wszystkim w sezonie zimowym: od października do marca na terenie półkuli północnej i od kwietnia do września w obszarze półkuli południowej.

U świń grypa nie rozprzestrzenia się zgodnie z wzorcem sezonowości, jak to ma miejsce u ludzi. Podtypy wirusa grypy: H1N1, H3N2 i H1N2 tworzą ogniska endemiczne, w których wirus ma możliwość długotrwałej replikacji, co utrwała w czasie miejsca stałego zakażenia. Genetyczne i antygenowe właściwości tych wirusów są w większości nieco różne na różnych

kontynentach, a w tych ramach w różnych regionach. Co więcej, linie genetyczne każdego podtypu krążą często równocześnie wśród świń, a liczba tych linii w ciągu ostatnich lat znacznie się zwiększyła, co nie miało miejsca do późnych lat dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia. Do tego okresu, pojedynczym podtypem w USA był klasyczny podtyp wirusa grypy świń – H1N1, który jest potomkiem wirusa pandemicznego z 1918 r. Do momentu powstania pierwszego reasortanta (lata pięćdziesiąte ubiegłego wieku) sezonowo pojawiające się u ludzi wirusy grypy miały tego samego przodka. W Europie wirus grypy świń H1N1, pochodzący od dzikich ptaków, określane jako „ptasiopodobny” („avian-like”) H1N1 – wirusem grypy świń i wirus H3N2, wywodzący się z wirusa pandemicznego Hong Kong z 1968 r., zaadaptowały się do świń, gdzie się ustaliły i zasiedliły w populacji tego gatunku zwierząt, w późnych latach siedemdziesiątych XX w. Jednak po transmisji do świń ludzki wirus grypy H3N2 uległ genetycznej reasortacji z ptasiopodobnym w H1N1 wirus grypy świń. Uzyskał on wszystkie sześć genów białek wewnętrznych wirusa grypy świń, ale zachował H3 i N2 od wirusa ludzkiego. Zgodnie z poglądem wyrażonym przez van Reeth (1), przedstawione dane stanowią powtarzający się kierunek ewolucji wirusa grypy świń, czyli skok antygenowy. Liczne wirusy grypy ludzi, które przełamują barierę gatunkową: człowiek – świnia, pozostają niewykrywalne w badaniach diagnostycznych, niemniej utrzymują się w tej populacji i podlegają dalszym mutacjom.

W wyniku mającej miejsce zmienności wirusa grypy od późnych lat dziewięćdziesiąt ubiegłego wieku, zaczęły występować i współistnieć w populacjach świń w Europie i Ameryce Północnej liczne, genetycznie różniące się linie wirusów grypy, z hemaglutyniną H1 i H3.

Wbrew oczekiwaniom, pierwszy pandemiczny wirus w XXI wieku nie pochodził od ptaków ani też nie należał do nowego podtypu. Natomiast okazał się on nowym reasortantem dwóch podtypów wirusa grypy świń z różnych regionów geograficznych.

Reasumując, z przedstawionych przez van Reeth (1) danych wynika szereg nowych stwierdzeń, dotyczących zwłaszcza wirusów grypy występujących u świń oraz zagrożeń z tego źródła ze strony nowych podtypów, chorobotwórczych dla ludzi. Ciągłe jednak istnieje w procesie wyjaśniania mechanizmów rozwijania się pandemii, a nawet epidemii grypy u ludzi szereg niewiadomych, które stanowią i w przyszłości będą stanowiły przedmiot badań, podobnie jak zaobserwowane zjawisko częstego przekazywania w odwrotnym

kierunku, od ludzi do świń, podtypów wirusa grypy (1).

W kolejnym doniesieniu Montserrat Torremorell (9) z Uniwersytetu w Minnesocie po omówieniu typowego obrazu klinicznego grypy świń poinformowała, że w USA odsetek świń z dodatnimi wynikami badań serologicznych, w tym świń nieszczepionych przeciw grypie i niewykazujących objawów klinicznych, sięga zależnie od regionu do 83%.

Zdaniem referującej, stwierdzane są liczne stada świń z endemiczną postacią grypy, co ma miejsce u świń nieszczepionych i szczepionych przeciw grypie. Świnie w USA są nosicielami podtypu wirusa pandemicznego A z 2009 r. U świń koegzystują różne, również inne podtypy oraz liczne linie i grupy wirusa grypy.

Er i wsp. (10) z Norweskiego Instytutu Weterynarii i Norweskiego Uniwersytetu Przyrodniczego poinformowali, że w 2009 r. w Norwegii po raz pierwszy stwierdzono grypę świń, wywołaną przez wirus grypy A-H1N1 (11, 12). Od tego czasu grypa świń występuje w Norwegii jako choroba endemiczna, czyli o utrzymujących się stale w czasie ogniskach zakażenia (13). Przeważnie ma ona przebieg podkliniczny (14, 15). W efekcie wykonanych obserwacji i badań potwierdzono, iż w Norwegii niska jest w stadach świń zachorowalność przy łagodnym przebiegu choroby, co różni tę postać od klasycznych objawów chorobowych SI (16). Mimo łagodnego lub podklinicznego przebiegu występująca w tym kraju grypa świń obniża wskaźniki produkcyjne, m.in. wykorzystanie paszy i dynamikę przyrostów masy ciała.

Ozawa i wsp. (17) z Japonii podali, że aktywność neutralizująca próbek surowicy, pochodzących od świń, określano z zastosowaniem nokautu genu reporterowego PB2 (PB2KO), który ulega ekspresji pośród wirusów grypy, których geny HA pochodzą z różnych pokrewnych szczepów wirusa grypy świń. Szczepy te zostały otrzymane poprzez modyfikacje genetyczne z użyciem wektorów plazmidowych, co opisano we wcześniejszych badaniach.

Badacze brazylijscy, Zanella i wsp. (18) przedstawili doniesienie na temat genetycznych markerów wirusa związanych ze skutecznością szczepień przeciw grypie świń. Stwierdzili, że typ A wirusa grypy jest jednym z najważniejszych patogenów oddechowego zespołu płucnego świni. W Brazylii w fermach świń krążą podtypy: H1N1, H1N2 i H3N2 (19). Zakażenia świń tymi podtypami powoduje znaczne straty ekonomiczne, związane z wysokim stopniem zachorowalnością. Tego rodzaju zakażenia posiadają też zdrowotny wydzźwięk globalny (20). W celu redukcji strat stosuje się szereg

strategii. Aktualnie szczepienia uznaje się jako najbardziej efektywną metodę łagodzenia skutków zakażenia, jak opóźnienie w rozwoju i poprawa wykorzystania paszy, jak też ograniczenie rozprzestrzeniania się choroby (21). Celem doniesienia było również bliższe poznanie mechanizmów sprawiających, że świnie reagują na tę samą szczepionkę, zależnie od mechanizmów genetycznych i wpływow środowiska.

Zgodnie z danymi Tsukahary i wsp. (22) z Uniwersytetu Prefektury Kioto – ważnym zespołem chorobowym układu oddechowego świń jest aktualnie inicjowany przez PCV2 zespół układu oddechowego, w którego etiologii wieloczynnikowej udział bierze m.in. wirus grypy świń.

Referujący dodał, że odnośnie do efektu szczepień przeciw grypie świń mniej zbadana jest odporność komórkowa niż odporność humoralna, chociaż oba rodzaje odporności są istotne w zapobieganiu i zwalczaniu wymienionej choroby. W nawiązaniu do tego w doniesieniu oceniono swoistą odporność komórkową przeciw grypie świń po zastosowaniu inaktywowanej szczepionki firmy Zoetis. Wykazano, że szczepionka po dwukrotnej iniekcji indukowała odporność humoralną. Stwierdzono również, że po szczepieniu prosiąt nastąpiła indukcja odporności komórkowej już po pierwszym podaniu szczepionki.

Z danych Diaza i wsp. (23) z Uniwersytetu w Minnesocie wynikało, że wirus grypy w obrębie populacji świń i między populacjami tych zwierząt w zakażonych stadach reprodukcyjnych zachowuje się bardzo dynamicznie. Autorzy wykazali liczne podtypy wirusa grypy, krążące w tej samej populacji trzody chlewnej, co wskazuje, że świnie w różnych grupach wiekowych i technologicznych mogą być „naczyniami mieszającymi” (mixing vessels) różnych podtypów i linii wirusa grypy świń. Wprowadzane do stada loszki mogą być wrażliwe na wirusy rezydujące w stadzie podstawowym; mogą też przenosić nowe szczepy, jeżeli włączane są do grupy pierwiastek. Prosięta ssące rodzą się jako wrażliwe na zakażenie i mogą uzyskać matczyną odporność na krążące wirusy grypy w danej fermie. Wyniki Diaza i wsp. (23) wskazują, że liczne wirusy grypy – różniące się między sobą właściwościami antygenowymi i genetycznymi – mogą współlistnieć w stadzie loch. Co więcej, również szczepy te podlegają zmienności, gdyż mogą wymieniać segmenty genów, stając się nowymi reasortantami. Podsumowując, wirusy grypy w stadzie loch mogą wykazywać duży stopień zmienności i stanowić źródło wirusów grypy różnych podtypów oraz linii dla świń w innych sektorach fermy.

We wniosku końcowym podsumowującym tematykę grypy świń stwierdza się, że w trakcie 7. Międzynarodowego Sympozjum w Kioto, poza niezwykle ciekawym wykładem plenarnym van Reeth (1), zaprezentowano szereg prac – z różnych części świata – uwidaczniających mającą nieprzerwanie miejsce zmienność wirusów grypy, co między innymi stwarza problemy w uzyskaniu w pełni satysfakcjonujących szczepionek przeciw grypie świń.

## Piśmiennictwo

- van Reeth K.: The explosive evolution of swine influenza viruses: Trying to see the wood for the trees, and the implications. *Proc. 7th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases*, Kyoto, Japan, 21–24. June 2015, 23–25.
- Markowska-Daniel I., Pejsak Z.: Grypa świń – przyczyny, epidemiologia, zasady postępowania, konsekwencje dla zdrowia publicznego. *Życie Wet.* 2007, **82**, 26–31.
- Trusczyński M., Samorek-Salamonowicz E.: Rola dzikich ptaków wędrownych w rozprzestrzenianiu się grypy ptaków. *Med. Weter.* 2008, **64**, 853–857.
- Markowska-Daniel I.: Świnie jako rezerwuuar wirusów grypy w aspekcie epidemii wywołanej nowym szczepem A H1N1. *Med. Weter.* 2009, **65**, 363–368.
- Trusczyński M., Samorek-Salamonowicz E.: Ocena zoonotycznego potencjału grypy ptaków i świń jako źródła wirusów chorobotwórczych dla człowieka. *Nauka* 2010, **1**, 37–47.
- Kawaoka Y., Krauss S., Webster R.G.: Avian to human transmission of the PB1 gene of influenza A virus in the 1957 and 1968 pandemics. *J. Virol.* 1989, **63**, 4603–4608.
- Scholtisek C.: Molecular evolution of influenza viruses. *Virus Genes* 1995, **11**, 209–215.
- Webster R.G.: Influenza viruses (*Orthomyxoviridae*). *Encyclopedia of Virology*, red.: Granoff F., Webster R.G. Academic Press, San Diego, 1999, 2, 824–829.
- Torremorell M.: Dynamics of influenza transmission in swine farms and options for control. *Proc. 7th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases*, Kyoto, Japan, 21–24. June 2015, 26.
- Er C., Lium B., Tavornpanich S., Hofmo P.O., Forberg H., Germundsson Hauge A.G., Grøntvedt C.A., Framstad T., Brun E.: Adverse effects of influenza (H1N1) pdm09 virus infection on growth performance of Norwegian pigs – A longitudinal study at a boar testing station. *Proc. 7th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases*, Kyoto, Japan, 21–24. June 2015, 86.
- Gjerset B., Er C., Lotvedt S., Jørgensen A., Hungnes O., Lium B., Germundsson A.: Experiences after Twenty Months with Pandemic Influenza A (H1N1) 2009 Infection in the Naïve Norwegian Pig Population. *Influenza Res. Treat.* 2011, ID 206975, 1–7.
- Hofshagen M., Gjerset B., Er C., Tarpai A., Brun E., Dannevig B., Bruheim T., Fostad I.G., Iversen B., Hungnes O., Lium B.: Pandemic influenza A(H1N1)v: human to pig transmission in Norway? *Euro. Surveill.* 2009, **14**, 15–17.
- Lium B., Er C., Zerihun A.: The Surveillance and Control Programme for Specific Virus Infections in Swine Herd in Norway 2013. W: Sviland S., Hellberg H., editors. *Surveillance and Control Programmes for Terrestrial and Aquatic Animals in Norway Annual Report 2012*. Oslo, Norway: Norwegian Veterinary Institute, 2014.
- Grøntvedt C.A., Er C., Gjerset B., Germundsson A., Framstad T., Brun E., Jørgensen A., Lium B.: Clinical Impact of Infection with Pandemic Influenza (H1N1) 2009 Virus in Naïve Nucleus and Multiplier Pig Herds in Norway. *Influenza Res. Treat.* 2011, ID 163745, 1–6.
- Er C., Lium B., Tavornpanich S., Hofmo P.O., Forberg H., Germundsson Hauge A., Grøntvedt C.A., Framstad T., Brun E.: Adverse effects of Influenza A (H1N1) pdm09 virus infection on growth performance of Norwegian pigs – a longitudinal study at a boar testing station. *BMC Vet. Res.* 2014, **10**, 284.
- Reeth K., Borwn I.H., Olsen C.W.: Influenza Virus. W: Zimmerman J.J., Karkier L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W.: *Diseases of Swine*. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, 2012, 10<sup>th</sup> Edition, 557–571.
- Ozawa M., Matsui A., Yonezawa K., Igarashi M., Okuya K., Kawabata T., Ito K., Tsukiyama-Kohara K., Taneno A., Deguchi E.: Efficient isolation of swine influenza viruses

- by age-targeted specimen collection. *Proc. 7th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases*, Kyoto, Japan, 21–24. June 2015, 89.
18. Zanella R., Gava D., Peixoto J.O., Schaeffer R., Zanella J.R.C., Biondo N., da Silva M.V.G., Cantão M.E., Ledur M.C.: Genetic markers associated with influenza vaccination efficacy in swine. *Proc. 7th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases*, Kyoto, Japan, 21–24. June 2015, 194.
  19. Schaeffer R., Rech R.R., Gava D., Cantão M.E., da Silva M.C., Silveira S., Zanella J.R.: A human-like H1N2 influenza virus detected during an outbreak of acute respiratory disease in swine in Brazil. *Arch. Virol.* 2015, **160**, 29–38.
  20. Olsen C.W., Brammer L., Easterday B.C., Arden N., Bela E., Baker I., Cox N.J.: Serologic Evidence of H1 Swine Influenza Virus Infection in Swine Farm Residents and Employees. *Emerg. Infect. Dis.* 2002, **8**, 814–819.
  21. Poland G.A., Ovsyannikova I.G., Kennedy R.B., Lambert N.D., Kirkland J.K.: A systems biology approach to the effect of aging, immunosenescence and vaccine response. *Current Opinion Immunol.* 2014, **29**, 62–68.
  22. Tsukahara T., Okutani M., Inoue R., Maruyama K., Shirai M., Arai S., Itoh S., Otake S.: Evaluation of cellular and humoral immune response after injection of swine influenza virus vaccine. *Proc. 7th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases*, Kyoto, Japan, 21–24. June 2015, 195.
  23. Diaz A., Culhane M., Torremorell M.: Temporal genetic characterization of influenza A viruses in swine breeding herds and role of different animal subpopulations. *Proc. 7th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases*, Kyoto, Japan, 21–24. June 2015, 197.
- 
- Prof. zw. dr hab. Marian Trusczyński, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, e-mail: mtruszcz@piwet.pulawy.pl