

## Występowanie *Cryptosporidium* spp. u muchówek synantropijnych na wybranych stanowiskach miejskich i wiejskich

### The occurrence of *Cryptosporidium* spp. in synanthropic flies in urban and rural environments

Maria Racewicz<sup>1</sup>, Wiesława Kruminis-Łozowska<sup>1</sup>, Refaat M. Gabre<sup>2</sup>, Joanna Stańczak<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakład Parazytologii Tropikalnej, Międzywydziałowy Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej, Gdański Uniwersytet Medyczny, ul. Powstania Styczniowego 9B, 81-519 Gdynia

<sup>2</sup> Faculty of Applied Medical Sciences, Tabuk University, Tabuk, Saudi Arabia

Adres do korespondencji: Maria Racewicz; E-mail: rama@amg.gda.pl

**ABSTRACT.** This study was carried out to determine the role of non-biting synanthropic flies as carriers of *Cryptosporidium* spp. oocysts in the vicinity of the city of Gdańsk (NE Poland). In 2001–2003, flies were collected from three breeding sites: cow sheds and meadows in the Bystra cattle farm and municipal landfill Szadółki using inhausters (aspirators) and entomologic nets. A total of 2358 specimens of the families: Muscidae (n=1598), Calliphoridae (n=739) and Sarcophagidae (n=21) were collected and analysed in 249 pools consisted of 9.5 insects, in average. Microscopic examination was used to detect *Cryptosporidium* spp. oocysts in the fly faeces deposited on the glass microscope slides and stained by Zhiel-Nielsen method. The mean number of faecal droplets per one glass slide was 11.5. Oocysts of *Cryptosporidium* spp., stained from light pink to bright red, were found in fly faeces deposited on 25 (27.5%) of 91 glass slides checked. The highest prevalence of the pathogen was observed in faecal droplets deposited by flies collected in municipal landfill (50% investigated slides). DNA of *Cryptosporidium* spp. was extracted from the surface eluants of flies and/or their gut homogenates and purified. Then extracts were examined by PCR using CPB-DIAGF and CPB-DIAGR primers amplifying a variable region SSU-rRNA of all *Cryptosporidium* species. Altogether 387 isolates, 228 from surfaces and 159 from gut homogenates, were obtained from 249 pools of flies and analyzed. A specific 435 bp fragment of DNA was obtained in 49 (12.7%) lysates tested. In 10.4% pools, DNA of the pathogen was detected only in the surface eluants while in 7.6% only in gut extracts. In the case of two pooled samples (0.8%) *Cryptosporidium* spp. was found in both types of lysates. In total, *Cryptosporidium* spp. was detected in 47/249 pools of flies (18.9%). Assumed that each positive pool contained just one infected fly, the percentage of specimens able to oocysts transmission were calculated at the minimal level 2.0% (n=47/2358). The result obtained confirm that synanthropic flies can harbour oocysts of *Cryptosporidium* spp. both externally and internally, and disseminate them mechanically in the environment. Therefore, under unsanitary conditions could be involved in the transmission of human and animal cryptosporidiosis.

**Key words:** *Cryptosporidium*, synanthropic flies, Muscidae, Calliphoridae, Sarcophagidae, PCR

#### Wstęp

Pierwotniaki z rodzaju *Cryptosporidium* są pasożytami jelitowymi występującymi zarówno u wielu

gatunków zwierząt, w tym u zwierząt hodowlanych – bydło, owce, kozy, świnie i konie, jak również u ludzi. Chorujący osobnik wydalą wraz z kałem ogromne ilości oocyst; w przypadku cieląt nawet

ok.  $10^{10}$  dziennie, tj.  $10^7$  w przeliczeniu na 1 g kału [1]. Oocysty *Cryptosporidium* spp. są bardzo odporne na działanie niekorzystnych czynników środowiska oraz wykazują długotrwałą, wysoką inwazyjność, przy czym dawka efektywna, wystarczająca do zarażenia, jest niewielka i wynosi średnio 132 oocysty [2]. Sprzyja to błyskawicznemu rozprzestrzenianiu pasożyta między wrażliwymi osobnikami.

Krążenie pierwotniaków z rodzaju *Cryptosporidium* w środowisku naturalnym jest słabo poznane. Potencjalnymi wektorami oocyst *Cryptosporidium* spp. mogą być, znane ze swej wyjątkowej aktywności epidemiologicznej, muchy domowe (*Musca domestica*) i inne muchówki synantropijne [3–7]. Owady te, przyciągane zapachem gnicia i fermentacji, wybierają na swe żerowiska i miejsca rozrodu odchody ludzkie i zwierzęce, wszelkie produkty rozkładu tkanek, odpadki kuchenne, śmieci itp. Znajdujące się na nich lub w ich przewodach pokarmowych mikroorganizmy chorobotwórcze muchy przenoszą mechanicznie i szeroko je rozprzestrzeniają.

Celem niniejszych pracy było zbadanie roli synantropijnych muchówek krótkoczułkich (łękorysych) (Diptera, Brachycera) w naturalnym krążeniu oocyst *Cryptosporidium* spp. na terenie miejskim (Trójmiasto) i wiejskim (wieś Bystra).

## Materiał i metody

Muchówki z trzech rodzin: Muscidae (muchy), Calliphoridae (plujki) i Sarcophagidae (ścierwice) odławiano na trzech stanowiskach zlokalizowanych: w oborze (I) i na łąkach (II) gospodarstwa hodowlanego bydła mlecznego na Żuławach (wieś Bystra ok. 12 km od Gdańska) oraz na wysypisku śmieci w Gdańsku-Szadółkach (III). Połowów dokonywano przy pomocy inhaustorów oraz siatek entomologicznych w okresie: sierpień–październik 2001, maj–październik 2002 oraz maj–wrzesień 2003. **Badania mikroskopowe.** Do klatek z odłowionymi muchami na 24 godziny wstawiano podstawowe szkiełka mikroskopowe celem zebrania odchodów owadów. Wszystkie szkiełka barwiono następnie standardową metodą Ziehl-Neelsen i przeglądano pod mikroskopem pod immersją w poszukiwaniu oocyst *Cryptosporidium* spp. **Badania molekularne.** Muchy, posegregowane wg ich przynależności do rodziny, badano indywidualnie lub w pulach zawierających od 2 do 20 osobników (średnio po 9,5 much/pulę). Owady uśmierca-

no przez zamrożenie w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$  i płukano w buforze PBS pH 7,2. Ponadto z wybranych losowo puli much wypreparowano przewody pokarmowe. Następnie z przewodów pokarmowych much oraz z płuczyn z powierzchni ich ciała, izolowano DNA *Cryptosporidium* spp. przy użyciu aparatu Fast Prep Instrument (BIO 101, USA), wg protokołu Da Silva i wsp. [8]. Ostatni etap oczyszczania DNA wykonywano przy użyciu komercyjnego zestawu „DNA Clean up” (A&A Biotechnology, Gdynia).

Uzyskane izolaty posłużyły do wykonania łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) ze znanymi z publikacji starterami CPB-DIAGF (5'–AAG CTC GTA GTT GGA TTT CTG–3') i CPB-DIAGR (5'–TAA GGT GCT GAA GGA GTA AGG–3') [9], pozwalającymi na amplifikację DNA wszystkich gatunków *Cryptosporidium* w zmiennym regionie SSU-rRNA, wg procedury podanej przez autorów.

Matryce do kontroli pozytywnej pochodziły z zasobów CDC w Atlancie, USA. Do kontroli negatywnej zamiast matrycy dodawano jałową, redetylowaną wodę. Reakcje przeprowadzano w termocyklarach Gene Amp PCR system 2400 i 9700 (Applied Biosystems).

Detekcji specyficznego produktu amplifikacji o wielkości 435 par zasad (pz) dokonywano metodą elektroforezy w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny, wobec wzorca masowego DNA (100–500 pz). Elektroforezę przeprowadzano w buforze Tris-Borate-EDTA (pH 8,2) przy napięciu 150 V i natężeniu 500 mA, przez 35 minut.

## Wyniki

Na trzech stanowiskach: w oborze (I) i na łąkach (II) gospodarstwa hodowlanego bydła mlecznego na Żuławach oraz na wysypisku śmieci w Gdańsku-Szadółkach (III) odłowiono ogółem 2358 synantropijnych muchówek krótkoczułkich z rodziny Muscidae (n=1598), Calliphoridae (n=739) i Sarcophagidae (n=21).

Oocysty *Cryptosporidium* spp. wykryto zarówno w drobinach kału much, jak i na powierzchni ciała oraz w przewodach pokarmowych tych owadów.

Aby ocenić występowanie pasożyta w kale przejrano pod mikroskopem 91 podstawowych szkiełek mikroskopowych, na których muchy złożyły odchody. Na każdym szkiełku znajdowało się od kilku do kilkudziesięciu drobin kału: ogółem 1047, średnio 11,5 na jedno szkiełko. Na 25 szkiełkach (27,5%) stwierdzono obecność barwią-

Tabela 1. Detekcja *Cryptosporidium* spp. w izolatach pochodzących z powierzchni ciała i przewodów pokarmowych much przy zastosowaniu specyficznych starterów reakcji PCR: CPB-DIAGF oraz CPB-DIAGR

Table 1. PCR detection of *Cryptosporidium* spp. in lysates from the exoskeletons and gut homogenizations of synanthropic flies using specific primers: CPB-DIAGF and CPB-DIAGR

Liczba badanych izolatów/liczba pozytywnych (% pozytywnych izolatów) No. lysates/no. positive (%positive)		
Powierzchnia ciała Exoskeletons	Przewody pokarmowe Guts	Razem Total
228/28 (12,3)	159/21 (13,2)	387/49 (12,7)

Tabela 2. Obecność oocyst *Cryptosporidium* spp. u much w zależności od przynależności odłowionych owadów do rodziny

Table 2. Presence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in flies according to the family

Rodzina	Liczba badanych puli No. pools tested	Liczba/% dodatnich puli* No./(%) positive pools	Liczba zbadanych owadów No. flies tested	Min.% zarażonych** Min.% infected	P
Muscidae	163	31/19,0	1598	1,9	>0,05
Calliphoridae	79	15/19,0	739	2,0	
Sarcophagidae	7	1/14,3	21	4,8	
Razem/Total	249	47/18,9	2358	2,0	

Objaśnienia/Explanations: \*pozytywne izolaty z powierzchni ciała i/lub przewodów pokarmowych (positive isolates from exoskeletons and/or guts of flies), \*\*przy założeniu, że każda pozytywna pula zawierała tylko jedną muchę z obecnością oocyst (provided that in each positive pool only one infected fly was present)

Tabela 3. Obecność oocyst *Cryptosporidium* spp. u much odłowionych w różnych miesiącach

Table 3. Presence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in flies collected in various months

Miesiąc odłowu Month of collection	Liczba pozytywnych/liczba zbadanych puli much No. positive/No. tested pools of flies			%dodatnich puli much ogółem % positive pools (totally)	Min.% zarażonych much* Min.% infected flies	P
	Powierzchnia ciała Exoskeleton	Przewody pokarmowe Guts	Razem Total			
V (May)	3/14	0/6	3/14	21,4	2,3	0,0807
VI (Jun)	12/55	0/38	12/57	21,1	2,2	
VII (Jul)	3/31	8/31	11/31	35,5	3,7	
VIII (Aug)	8/69	7/44	13/73	17,8	1,9	
IX (Sept)	0/35	4/35	4/50	8,0	0,8	
X (Oct)	2/24	2/5	4/24	16,7	1,8	

Objaśnienia/Explanations): \*przy założeniu, że pojedyncza pula składa się średnio z 9,5 much i każda pozytywna pula zawierała tylko jedną muchę z obecnością oocyt (provided that single pool consisted of avg. 9.5 flies and each positive pool contained only one infected fly)

Tabela 4. Obecność oocyst *Cryptosporidium* spp. u much odłowionych na poszczególnych stanowiskach  
Table 4. Presence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in flies according to the collections site

Stanowisko odłowu Collection site	Liczba pozytywnych/liczba zbadanych puli much No. positive/No. tested pools of flies			% dodatnich puli much ogółem % positive pools (totally)	Min.% zarażonych much* Min.% infected flies	P
	Powierzchnia ciała Exoskeleton	Przewody pokarmowe Guts	Razem Total			
I	15/127	14/77	28/129	21,7	2,3	0,0383
II	4/55	3/52	7/74	9,5	1,0	
III	9/46	4/30	12/46	26,0	2,7	

Objaśnienia/Explanations): \*I – obora i II – łąki gospodarstwa rolnego w Bystrej na Żuławach oraz (III) wysypisko śmieci w Gdańsku-Szadółkach (I – cow-shed and II – meadows of Bystra farm (Żuławy region), and III – municipal landfill Szadółki)  
\*\* przy założeniu, że pojedyncza pula składa się średnio z 9,5 much i każda pozytywna pula zawierała tylko jedną muchę z obecnością oocyst (provided that single pool consisted of avg. 9.5 flies and each positive pool contained only one infected fly)

cych się swoiście na różowo-czerwono oocyst *Cryptosporidium* spp. Oocysty stwierdzono na 5/10 szkiełek (50%) zawierających kał much złapanych na wysypisku śmieci oraz na 12/40 szkiełek (30%) i 8/41 szkiełek (19,5%) z odchodami much odłowionych odpowiednio na pastwiskach i w oborach gospodarstwa bydła mlecznego na Żuławach.

Przy zastosowaniu techniki PCR przebadano 2358 much w 249 pulach. DNA patogenu ekstrahowano z powierzchni ciała i/lub przewodów pokarmowych much danej puli. Łącznie uzyskano i poddano amplifikacji 387 izolatów, odpowiednio: 228 i 159. Prążek wielkości 435 pz, charakterystyczny dla *Cryptosporidium* spp., uzyskano w przypadku 49 izolatów (12,7%). Odsetki wyników pozytywnych, w zależności od pochodzenia izolatu DNA, były porównywalne i wynosiły 12,3% i 13,2% (Tabela 1).

W 26 badanych pulach much (10,4%), DNA pasożyta wykryto wyłącznie w ekstraktach z powierzchni ciała owadów, w 19 (7,6%) wyłącznie w ekstraktach z przewodów pokarmowych, a jedynie w przypadku dwóch puli much (0,8%) w izolatach pochodzących z obu rodzajów badanego materiału.

Ogółem *Cryptosporidium* spp. wykryto w 47/249 puli much (18,9%). Przy założeniu, że każda dodatnia pula zawierała jedynie jedną zarażoną muchę, minimalny odsetek osobników zdolnych do transmisji oocyst wynosił 2,0% (n=47/2358) (Tabela 2). Zarówno odsetki pozytywnych puli (14,3–19,0%), jak i minimalny poziom zarażenia (1,9–4,8%) badanych Muscidae, Calliphoridae i Sarcophagidae były porównywalne (P>0,05) (Tabela 2).

Obecność oocyst *Cryptosporidium* spp. na powierzchniach lub w przewodach pokarmowych much stwierdzano przez cały sezon badawczy, od maja (2,3%) do października (1,8%), a minimalny poziom liczebny w kolejnych miesiącach był odpowiednio porównywalny (P=0,0807) (Tabela 3).

Zaobserwowano różnice w poziomie obecności patogenu w zależności od stanowiska odłowu much (Tabela 4). Minimalne odsetki owadów z obecnością oocyst *Cryptosporidium* spp. odnotowane w oborach gospodarstwa w Bystrej (2,3%) i na wysypisku śmieci w Gdańsku-Szadółkach (2,7%) były porównywalne (P=0,588), natomiast odsetek stwierdzony na łąkach gospodarstwa w Bystrej był od nich znamienne, odpowiednio 2,3–2,7 razy, niższy (P=0,0383).

### Omówienie wyników

Wyniki naszych badań potwierdzają przyjęte założenie, że muchówki mogą pełnić w Polsce istotną rolę w rozprzestrzenianiu pasożytniczych pierwotniaków z rodzaju *Cryptosporidium* na tereny podmiejskie i miejskie.

Dotychczas niewiele wiadomo o roli muchówek synantropijnych w rozprzestrzenianiu *Cryptosporidium* spp. Badania w tym zakresie podjęto dopiero w ostatnich latach, głównie w Stanach Zjednoczonych [3,10,11]. Piśmiennictwo europejskie zawiera natomiast zaledwie jedną pozycję [12]. Badania nasze potwierdziły, że synantropijne Diptera z dzikich populacji Muscidae, Calliphoridae i Sarcophagidae mogą mechanicznie przenosić oocysty *Cryptosporidium* spp., w tym *C. parvum*, zarówno na po-



wierzchni ciała jak i w przewodzie pokarmowym [7]. Zatem są one naturalnymi łącznikami pomiędzy skupiskami odpadów a innymi substratami, na których również żerują, w tym różnymi produktami żywnościowymi, rozsiewając oocysty poprzez bezpośredni kontakt powierzchni ciała z odchodami, wymiocinami itp.

Minimalny poziom obecności oocyst, przy założeniu, że każda dodatnia pula zawierała tylko jedną noszącą oocysty muchę, wynosił 2,0%. Odsetek ten jest porównywalny z uzyskanym dla *Musca domestica* z terenów miejskich w Aragonii, Hiszpania [12]. Przebadano tam 60 puli much, z których każda liczyła 10 osobników i *C. parvum* wykryto w 11 pulach (18%). Przy założeniu jw. minimalny poziom obecności oocyt wyniósłby zatem 1,8%. W rzeczywistości naturalny poziom zarażenia jest zapewne znacznie wyższy. Graczyk i wsp. [4,10] podają bowiem, że wszystkie odłowione przez nich muchówki z dzikich populacji Calliphoridae, Sarcophagidae, Muscidae, Anthomyiidae i Psychodidae miały oocysty *C. parvum* na powierzchni ciała. Średnio na jedną muchę przypadało od 50 do 73 oocyst. Ponadto analiza odchodów tych muchówek również wykazała w nich obecność oocyst, np. w przypadku *M. domestica* pojedyncza drobinka kału zawierała średnio  $7 \pm 3,2$  oocysty [3]. Stwierdzano je również na powierzchni ciała larw i poczwerek w liczbie ok. 150 i 300, w zależności od stadium. Nadmienić tu jeszcze należy, że oocysty pozostawały inwazyjne.

Źródłem oocyst *Cryptosporidium* spp. na terenie łąk i w oborach gospodarstwa hodowlanego bydła mlecznego na Żuławach były bez wątpienia odchody krów naturalnie zarażonych tym pasożytem, którego występowanie odnotowano tam już kilka lat temu [13]. Po raz pierwszy stwierdzono też wówczas możliwość zarażenia bydła nie tylko *C. parvum*, ale również *C. felis*, gatunkiem do niedawna notowanym wyłącznie u kotów [14] i osób chorych na AIDS [15].

Wyniki naszych badań są zgodne z rezultatami innych badań terenowych [10] oraz laboratoryjnych, z *M. domestica* jako modelem [3]. Muchy te miały kontakt z odchodami bydlęcymi zawierającymi oocysty *C. parvum*. Oocysty znajdowano następnie zarówno na powierzchni ciała, jak i w przewodzie pokarmowym owadów. Wykrywano je również na powierzchniach odwiedzanych przez muchy (średnio 108 oocyst/1cm<sup>2</sup>).

Zapach odchodów bydlęcych silnie przyciąga muchy, które wybierają je na swe żerowiska i miej-

sce rozrodu, a ich lepkość dodatkowo sprzyja naturalnej zdolności szczecinek i włosków much do „wyłapywania” drobinek kału wraz z oocystami *Cryptosporidium*. Trudno jednak jednoznacznie określić źródło zarażenia much na wysypisku śmieci pod Gdańskiem, tym bardziej, że odsetek zarażonych owadów właśnie tam był najwyższy. Można ewentualnie domniemywać, że do zarażenia doszło na terenach okolicznych drobnych gospodarstw rolnych. Muchówki mogą bowiem dokonywać dość długich przelotów, co powoduje, że owady te są naturalnymi łącznikami pomiędzy różnymi skupiskami odchodów i odpadków.

### Wniosek

Synantropijne muchówki krótkoczułkie (Diptera: Muscidae, Calliphoridae, Sarcophagidae) rozwijające się w/lub mające kontakt z odchodami i odpadami zanieczyszczonymi oocystami *Cryptosporidium* spp. mogą je mechanicznie przenosić i rozprzestrzenić na nowe miejsca. Tym sposobem muchówki mogą pełnić rolę efektywnych, mechanicznych wektorów patogenu, a w przypadku złych warunków higienicznych być włączone w transmisję zwierzęcej i ludzkiej kryptosporydiozy.

### Literatura

- [1] Blewett D.A. 1989. Quantitative techniques in *Cryptosporidium* research. In: Cryptosporidiosis Proceedings of the 1st International Workshop, Edinburgh, Scotland. (Eds: K.W. Angus, D.A. Blewett): 85–95.
- [2] Dupont H.L., Chappell C.L., Sterling C.R., Okhuysen P.C., Rose J.B., Jakubowski W. 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *The New England Journal of Medicine* 332: 855–859.
- [3] Graczyk T.K., Cranfield M.R., Fayer R., Bixler H. 1999. House flies (*Musca domestica*) as transport hosts of *Cryptosporidium parvum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 61: 500–504.
- [4] Graczyk T.K., Fayer R., Cranfield M.R., Mhangami-Ruwende B., Knihgt R., Trout J.M., Bixler H. 1999. Filth flies are transport hosts of *Cryptosporidium parvum*. *Emerging Infections Disease* 5: 726–727.
- [5] Szostakowska B., Kruminis-Łozowska W., Racewicz M., Knight R., Tamang L., Myjak P., Graczyk T.K. 2004. *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* recovered from flies on a cattle farm and in a landfill. *Applied Environmental Microbiology* 70: 3742–3744.
- [6] Dillingham R.A., Lima A.A., Guerrant R.L. 2002. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and Infection* 4: 1059–1066.

- [7] Graczyk T.K., Knight R., Tamang L. 2005. Mechanical transmission of human protozoan parasites by insects. *Clinical Microbiology Reviews* 18: 128–132.
- [8] Da Silva A.J., Bornay-Llinares F.J., Moura I.N.S., Slemenda S.B. 1999. Fast and reliable extraction of protozoan parasite DNA from fecal specimens. *Molecular Diagnosis* 4: 1–6.
- [9] Johnson D.W., Pieniazek N.J., Griffin D.W., Misener L., Rose J.B. 1995. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Applied Environmental Microbiology* 6: 3849–3855.
- [10] Graczyk T.K., Fayer R., Knight R., Mhangami-Ruwende B., Trout J.M., Da Silva A.J., Pieniazek N.J. 2000. Mechanical transport and transmission of *Cryptosporidium parvum* oocysts by wild filth flies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 63: 178–183.
- [11] Graczyk T.K., Grimes B.H., Knight R., Da Silva A.J., Pieniazek N.J., Veal D.A. 2003. Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* carried by synanthropic flies by combined fluorescent *in situ* hybridization and monoclonal antibody. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68: 228–232.
- [12] Clavel A., Doiz O., Morales S., Varea M., Seral C., Castillo F.J., Fleta J., Rubio C., Gomez-Lus R. 2002. House fly (*Musca domestica*) as a transport vector of *Cryptosporidium parvum*. *Folia Parasitologica* 49: 163–164.
- [13] Bornay-Llinares F.J., Da Silva A.J., Moura I.N.S., Myjak P., Pietkiewicz H., Kruminis-Łozowska W. 1999. Identification of *Cryptosporidium felis* in a cow by morphologic and molecular methods. *Applied Environmental Microbiology* 65: 1455–1458.
- [14] Sargent K.D., Morgan U.M., Elliot A., Thompson R.C.A. 1998. Morphological and genetic characterisation of *Cryptosporidium* oocysts from domestic cats. *Veterinary Parasitology* 77: 221–227.
- [15] Pieniazek N.J., Bornay-Llinares F.J., Slemenda S.B., Da Silva A.J. 1999. New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. *Emerging Infections Diseases* 5: 444–449.

Wpłynęło 25 grudnia 2008

Zaakceptowano 15 kwietnia 2009