

Szczepionki nowej generacji przeciw zakażeniu wirusem grypy koni

MAŁGORZATA PURZYCKA, WOJCIECH ROŻEK, JAN F. ŻMUDZIŃSKI

Zakład Wirusologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Purzycka M., Rożek W., Żmudziński J. F.

New generation of vaccines against equine influenza virus infection

Summary

Influenza virus is the main etiological agent of respiratory diseases in horses. Equine influenza virus is represented by two different serotypes: H7N7 and H3N8. The H7N7 strain has not been isolated since 1980 and H3N8 circulates in equine population throughout most of the world. Inactivated and subunit vaccines are most commonly used in order to prevent infections. These vaccines, in contrast to natural infections, do not induce either cytotoxic lymphocytes T or mucosal antibodies, nor do they provide long-lasting immunity. The introduction of new types of vaccines has become necessary and the first group of new generation vaccines is those containing live viral strains. They may be produced by attenuation in low temperature or by reverse genetics. Viral vector vaccines may be included in this group of vaccines. The next group of new generation of vaccines consists of a DNA vaccine and an inactivated vaccine with new adjuvants.

Keywords: equine influenza virus, new vaccines

Jednym z głównych czynników etiologicznych wywołujących schorzenia układu oddechowego u koni jest wirus grypy. Powoduje on straty zwłaszcza w hodowli koni wierzchowych, sportowych, bowiem zwierzęta rekonwalescenci często nie powracają do stanu zdrowia sprzed zachorowania. Wymiana koni pomiędzy stadninami, torami wyścigowymi zwiększa ryzyko transmisji zakażenia. W takiej sytuacji immunoprophylaktyka grypy ma bardzo istotne znaczenie. W celu zapobiegania infekcjom zaleca się czynne uodpornianie koni (28).

Szczepionki przeciwko grypie koni i ich skuteczność

Najpowszechniej stosowane są szczepionki zawierające inaktywowane wirusy oraz szczepionki podjednostkowe. Szczepionki inaktywowane wykorzystują kompletne cząstki wirusowe inaktywowane najczęściej substancjami chemicznymi. Natomiast szczepionki podjednostkowe zawierają w swym składzie oczyszczone wirusowe glikoproteiny powierzchniowe: hemaglutyninę (HA) i neuraminidazę (NA). Szczepionki inaktywowane i szczepionki podjednostkowe nie zapewniają długotrwałej odporności, a w szczególności są nieskuteczne u młodych koni (6, 11, 12, 20). Zastosowanie w szczepionce szczepu blisko spokrewnionego z tym, który aktualnie krąży w populacji koni, zdecydowanie poprawia jej efektywność. Każdego roku OIE (World Organisation of Animal Health), na

podstawie charakterystyki ostatnio izolowanych szczepów grypy koni ogłasza, które szczepy są rekomendowane do produkcji szczepionek. Szczepami ogłoszonymi w styczniu 2006 r. jako rekomendowane są: A/eq/South Africa/4/2003 (H3N8) linia amerykańska (lub A/eq/Ohio/2003) oraz A/eq/Newmarket/2/93 (H3N8) linia europejska (lub A/eq/Suffolk/89 i A/eq/Borlänge/91) (1).

Szczepionki nowej generacji zawierające żywe szczepy wirusowe

Zastosowanie w szczepionkach żywych szczepów wirusowych, które nie wywołują objawów chorobowych, natomiast pobudzają układ immunologiczny, daje szansę na efektywniejszą i dłuższą odporność porównywalną do odporności poinfekcyjnej. Szczepy mające zastosowanie w tym przypadku można uzyskać poprzez atenuację z wykorzystaniem niskich temperatur lub nowoczesnej techniki genetycznej określanej jako reverse genetics. Stosowane są również wirusowe wektory szczepionkowe dla genów białek wirusa grypy (2, 4, 18).

Nowa, donosowa szczepionka zawierająca modyfikowany żywy wirus, otrzymana z zastosowaniem atenuacji szczepu macierzystego poprzez stopniowe obniżanie temperatury namnażania (szczepionka zatwierdzona do użytku)

Przykładem wprowadzania nowych typów szczepionek jest szczepionka MLV (modified-live virus) – Flu

Avert. Szczepionka zawiera w swym składzie modyfikowany, żywy wirus grypy koni. W celu otrzymania szczepu wirusowego zastosowano atenuację poprzez serię pasażów na zarodkach kurzych ze stopniowym obniżaniem temperatury do 26°C. Szczepionka w przeciwieństwie do tradycyjnej inaktywowanej, nie posiada w swym składzie adjuwantu i jest podawana donosowo. Celem atenuacji było uzyskanie szczepu wirusowego, wydajnie namnażającego się w niższych temperaturach. Ta niższa temperatura występuje w górnych drogach oddechowych koni, gdzie indukowana jest lokalna i systemowa odpowiedź immunologiczna. Mutant wrażliwy na temperaturę niezdolny jest do replikacji w obrębie dolnych dróg oddechowych, gdzie temperatura jest zdecydowanie wyższa. Wirus wykorzystany w szczepionce otrzymano z dzikiego szczepu H3N8 A/equine/KY/91. Klony wirusa zostały wyselekcjonowane z poszczególnych pasażów i scharakteryzowane fenotypowo pod względem stabilności oraz wrażliwości na temperaturę z użyciem linii komórkowej MDCK (Madin Darby Canine Kidney). Selekcja opierała się na obserwacji efektu cytopatycznego oraz badaniu intensywności syntezy białek w temperaturze 34°C w porównaniu do 39,5°C. Wybrane klony zostały poddane testom na bezpieczeństwo oraz skuteczność. Fenotyp spełniający oczekiwania otrzymano w pasażu 34. Szczep użyty do szczepionki wykazywał stabilność zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Efektem szczepienia była indukcja odporności wobec szczepów heterologicznych grypy A2 z linii amerykańskiej oraz europejskiej (4, 14).

Odpowiedź układu immunologicznego występuje 2 tygodnie po szczepieniu MLV i charakteryzuje się wzrostem poziomu immunoglobulin: IgG₁ i IgG₂ w surowicy. Szczyt miana immunoglobulin IgG₁ następuje pomiędzy 2. a 4. tygodniem po szczepieniu, następnie miano spada w ciągu kolejnych 2 miesięcy. Najwyższy poziom immunoglobulin IgG₂ jest osiągnięty około 4. tygodnia po szczepieniu.

Szczepienie donosowe MLV u ludzi prowadzi do powstania immunoglobulin IgA w wydzielinie górnych dróg oddechowych. W przypadku szczepienia koni nie zaobserwowano takiego zjawiska (14). Przeprowadzone badania dowodzą, że szczepienie nawet pojedynczą dawką MLV koni, które wcześniej nie miały kontaktu z wirusem grypy zapewnia 3-miesięczną ochronę przed zakażeniem szczepem homologicznym. Inaktywowana szczepionka komercyjna zawierająca zabity wirus nie zapewnia takiej ochrony (13).

Pojawia się niebezpieczeństwo, że szczepionki MLV, pomimo swojej wyższej skuteczności, mogą stanowić zagrożenie dla zwierząt o obniżonej odporności oraz niosą ryzyko rewersji szczepu atenuowanego do formy patogennej (16). Doświadczenia przeprowadzone na koniach poddanych znacznemu wysiłkowi fizycznemu przed szczepieniem w celu obniżenia kondycji oraz mitogenezy limfocytów dowiodły, że i dla takiej

grupy zwierząt szczepienie jest bezpieczne i zapewnia ochronę przed zakażeniem w równym stopniu, jak u zwierząt nie poddanych stresowi (4).

Zastosowanie techniki reverse genetics

Technika reverse genetics pozwala na skonstruowanie całkowicie „sztucznego” wirusa – rekombinanta dzięki sklonowanemu cDNA, kodującego poszczególne białka wirusowe. Możliwe jest „złożenie” w jeden wirion genów, dzięki którym wirus będzie charakteryzował się cechami pożądanymi dla szczepu szczepionkowego: będzie bezpieczny oraz immunogenny. Dla uzyskania takiego szczepu wirusowego można zastosować różne manipulacje genetyczne: wprowadzić do organizmu zwierzęcia geny HA, NA cyrkulujących obecnie wirusów oraz geny konserwatywne ze szczepu laboratoryjnego, łatwo namnażającego się; skonstruować wirion bez genu dla białka NS1 (białko ma aktywność antagonisty interferonu, nieblokowany interferon indukowany infekcją wirusową zapobiega replikacji wirusowej); stworzyć mutant NS2 (doprowadzenie do pojedynczego cyklu replikacyjnego, bez formowania cząstek infekcyjnych). Technika reverse genetics pozwala na konstrukcję atenuowanego wirusa w sposób stosunkowo szybki i precyzyjny. Jednakże jest to koncepcja jeszcze dość odległa od zastosowania praktycznego (18, 19, 24, 25).

Wykorzystanie wektorów szczepionkowych

Zasada działania szczepionek tzw. wektorowych opiera się na wprowadzaniu do genomu niechorobotwórczego wirusa wybranych genów wirusa patogenego. Bezpieczny dla organizmu wirus namnaża się i zapewnia ekspresję wybranych białek patogenego szczepu i tym samym indukuje skierowaną przeciwko nim odpowiedź immunologiczną. Antygeny są prezentowane przez MHC klasy I oraz II, stymulowana jest odpowiedź zarówno humoralna, jak i komórkowa. Wirusy zastosowane w tego typu szczepionkach powinny być genetycznie stabilne oraz zdolne do przyjęcia dużego fragmentu obcego genomu. Szczep wirusa krowianki MVA (modified vaccinia Ankara) jest przykładem wirusa będącego modelem wektora wirusowego przenoszącego geny wirusa grypy koni. Jest to szczep atenuowany, posiadający znaczny defekt replikacyjny. Do genomu tego wirusa wprowadzone zostały geny HA, NA, NP (3). Jednakże dla zapewnienia skutecznej ochrony przed zakażeniami z wykorzystaniem szczepionek wektorowych stosuje się szczepienia mieszane. Jest to strategia, gdzie pierwszym szczepieniem jest szczepienie szczepionką DNA (ekspresja HA i NP), a następnie szczepienie z użyciem modyfikowanego szczepu Ankara. Takie postępowanie wywołuje silną indukcję surowicznych przeciwciał IgG₁ i IgG₂, proliferację limfocytów, produkcję INF- γ . Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że tego typu szczepienie indukuje wydzielnicze przeciwciała IgA (2). Przeprowadzone badania dowodzą, że zastosowanie

rekombinowanego wektora MVA z genami wirusa grypy jako szczepionki zapewniają skuteczną ochronę przed zakażeniem.

W 2003 r. modyfikowany wirus canarypox został zatwierdzony jako wektor kodujący białka HA reprezentatywne dla linii europejskiej oraz linii amerykańskiej wirusa grypy koni i zastosowany jako szczepionkowy w szczepionce ProteqFlu zatwierdzonej do użytku w Unii Europejskiej. W skład szczepionki wchodzi również adjuwant – Carbomer 974P. Szczepionka zapewnia ochronę przed zakażeniem szczepami pokrewnymi w stosunku do kodowanej hemagglutyniny. Zjawisko dryftu genetycznego, charakterystyczne dla wirusa grypy koni, powoduje potrzebę ciągłych modyfikacji genetycznych dla utrzymania jej efektywności (7, 10, 23).

Szczepionki DNA

Badania dotyczące zastosowania plazmidów DNA jako szczepionek, rozpoczęły się we wczesnych latach 90. Podstawą immunizacji z użyciem DNA, jest zdolność komórki do pobrania „nagiego” DNA (transfekcja), dzięki czemu dochodzi do ekspresji obcych genów w komórce. Geny wprowadzane do plazmidów są pod kontrolą eukariotycznych promotorów. Szczepionki DNA eliminują ryzyko rewersji do formy patogennej, jakie może mieć miejsce przy zastosowaniu szczepionek zawierających żywe szczepy wirusowe, brak jest towarzyszących substancji pochodzenia zwierzęcego – materiał jest wysoce oczyszczony. Z technicznego punktu widzenia produkcja plazmidów DNA nie jest droga, są one stabilne i mogą być przechowywane przez długie okresy w formie zliofilizowanej (16). Szczepienie DNA zapewnia, że immunogeny są syntetyzowane *de novo*. Dzięki transfekcji DNA do komórek gospodarza antygeny mogą być prezentowane przez MHC klasy I oraz II, w rezultacie stymulowana jest odpowiedź zarówno humoralna, jak i komórkowa (9, 21).

Szczepionki DNA najczęściej w swym składzie posiadają geny dla HA. Wprowadzane są również geny dla NP i IL-6 oraz adjuwanty, jak np. toksyna przecinkowca cholery (5, 27).

Badania przeprowadzone na myszach dowiodły, że szczepionka HA-DNA zapewnia ochronę przed zakażeniem dzięki indukcji przeciwciał neutralizujących – surowicznych IgA i IgG (22). Badania skuteczności szczepionki DNA przeprowadzane na koniach (szczepiono je śródskórnym oraz w na śluzówkę górnych dróg oddechowych – 60 miejsc iniekcji, 3 immunizacje, 70 i 42 dni przerwy pomiędzy kolejnymi immunizacjami) wykazały, że po cyklu szczepień osiągnięta jest częściowa lub całkowita odporność na zakażenie szczepem homologicznym (15, 26).

Szczepienie DNA powoduje u koni indukcję surowicznych immunoglobulin IgG₁ i IgG₂, wydzielniczych IgG, brak jednak indukcji wydzielniczych przeciwciał IgA. Wprowadzenie dodatkowo genu kodującego IL-6,

nie wywołuje indukcji wydzielniczych immunoglobulin IgA, natomiast pobudza odpowiedź pomocniczych limfocytów T. Zaobserwowano również poszczepioną indukcję INF- γ (26). Ostatnie badania dowodzą, że możliwe jest pobudzenie układu immunologicznego w kierunku produkcji wydzielniczych przeciwciał IgA poprzez podwójną donosową immunizację szczepionką HA-DNA, która następuje po podwójnym szczepieniu śródskórnym oraz na błony śluzowe górnych dróg oddechowych (23).

Zastosowanie adjuwantu – toksyny przecinkowca cholery (CT) i (CTB) dodatkowo stymuluje zarówno humoralną, jak i komórkową odpowiedź immunologiczną oraz wpływa na indukcję wydzielniczych przeciwciał IgA w porównaniu z zastosowaniem szczepionki HA-DNA bez adjuwantu. Szczepione konie nie są jednak w pełni chronione przed infekcją wirusową. Bardzo interesujące jest to, że niektóre konie po szczepieniu zachowują pełną odporność na zakażenie pomimo bardzo niskiego poziomu przeciwciał surowicznych (27).

Kuce zakażone wirusem grypy produkują przeciwciała IgG₁ i IgG₂ w węzłach chłonnych śródpiersiowych. Natomiast szczepienie DNA śródskórne oraz na błony śluzowe indukuje aktywację monocytów i limfocytów we krwi obwodowej oraz w limfatycznych węzłach pachwinowych. Zarówno szczepienie HA-DNA, jak i naturalna infekcja indukują surowicze immunoglobuliny IgG₁ i IgG₂ (26).

Szczepienia DNA zapewniają zdecydowanie skuteczniejszą ochronę w porównaniu z konwencjonalnymi szczepionkami inaktywowanymi. Jednakże badania dowodzą, że nie zapewniają 100% ochrony przed zakażeniem. Mało praktyczne są również metody podawania szczepionki – zalecane jest podawanie w wielu miejscach na błony śluzowe, śródskórnym oraz donosowo (23).

Kierunki modernizacji szczepionek

Wprowadzane nowe strategie dotyczące szczepionek przeciwko grypie koni mają na celu stymulację odpowiedzi immunologicznej humoralnej, komórkowej i wywołanie ochrony przed infekcją porównywalnej do tej, jaką indukuje naturalne zakażenie. Szczepionki tradycyjne zawierające inaktywowane wiriony lub podjednostki wirusowe, zapewniają krótkoterminową ochronę wobec szczepów homologicznych i indukują przede wszystkim odpowiedź humoralną. Szczepionki zawierające szczepy atenuowane oraz szczepionki DNA zapewniają lepszą ochronę przed zakażeniem niż szczepionki tradycyjne. Inne kierunki modernizacji szczepionek to zastosowanie nowych adjuwantów, np.: liposomowych z cholesterolem, ciepłochwiejnej toksyny *E. coli*, syntetycznych adjuwantów (syntetyczny lipid A, syntetyczne dwuniciowe RNA) (16, 24) czy cząstek interferujących wirusa grypy (defective-interfering RNAs – DI). Cząstki DI powstają na skutek pasażowania wirusa

z użyciem wysokich inokulów wirusa (17). Nadzieję budzi również szczepionka, w skład której wchodzi białko M2. Jest ono trzecim, obok hemaglutyniny i neuraminidazy, białkiem wchodzącym w skład otoczki wirusowej. W cząsteczce wirusowej występuje w niewielkiej liczbie kopii. Sytuacja przedstawia się inaczej w błonach zakażonych komórek, gdzie białko to wykazuje dużą ekspresję. Zablokowanie działania białka M2 efektywnie zapobiega replikacji wirusowej już w pierwszych etapach zakażenia. W przeciwieństwie do zmiennych glikoprotein powierzchniowych: HA i NA, białko M2 jest konserwatywne, dzięki czemu szczepionka może być uniwersalna i prawdopodobnie skuteczna wobec zupełnie nowych szczepów wirusa grypy (8).

Piśmiennictwo

1. *Anon.*: Conclusions and recommendations from the Expert Surveillance Panel on Equine Influenza Vaccines. OIE Bulletin 2006, 2, 35-36.
2. *Breathnach C. C., Clark H. J., Clark R. C., Olsen C. W., Townsend H. G., Lunn D. P.*: Immunization with recombinant modified vaccine Ankara (rMVA) constructs encoding the HA or NP gene protects ponies from equine influenza virus challenge. *Vaccine* 2006, 24, 1180-1190.
3. *Breathnach C. C., Rudersdorf R., Lunn D. P.*: Use of recombinant modified vaccine Ankara viral vectors for equine influenza vaccination. *Vet. Immunol. Immunopath.* 2003, 98, 127-136.
4. *Chambers T. M., Holland R. E., Tudor L. R., Townsend H. G. G., Cook A., Bogdan J., Lunn D. P., Hussey S., Whitaker-Dowling P., Youngner J. S., Sebring R. W., Penner S. J., Stiegler G. L.*: A new modified live equine influenza virus vaccine: phenotypic stability, restricted spread and efficacy against heterologous virus challenge. *Equine Vet. J.* 2001, 33, 630-636.
5. *Chen Z., Sahashi Y., Matsuo K., Asanuma H., Takahashi H., Iwasaki T., Suzuki Y., Aizawa Ch., Kurata T., Tamura S.*: Comparison of the ability of viral protein-expressing plasmid DNAs to protect against influenza. *Vaccine* 1998, 16, 1544-1549.
6. *Cox R. J., Brokstad K. A., Ogra P.*: Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live attenuated influenza vaccines. *Scand. J. Immunol.* 2004, 59, 1-15.
7. *Daly J. M., Newton J. R., Mumford J. A.*: Current perspectives on control of equine influenza. *Vet. Res.* 2004, 35, 411-423.
8. *De Filette M., Min Jou W., Birkett A., Lyons K., Schultz B., Tonkyro A., Resch S., Fiers W.*: Universal influenza A vaccine: Optimization of M2-based constructs. *Virology* 2005, 337, 149-161.
9. *Dufour V.*: DNA vaccines: new applications for veterinary medicine. *Vet. Sci. Tommor.* 2001, 2, 1-16.
10. *Edlund Toulemonde C., Daly J., Sindle T., Guigal P. M., Audonnet J. C., Minke J. M.*: Efficacy of a recombinant equine influenza vaccine against challenge with an American lineage H3N8 influenza virus responsible for the 2003 outbreak in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 2005, 156, 367-371.
11. *Fouchier R. A. M., Osterhaus A. D. M. E., Brown I. H.*: Animal influenza virus surveillance. *Vaccine* 2003, 21, 1754-1757.
12. *Hannant D., Jessett D. M., O'Neil T., Sundquist B., Mumford J. A.*: Nasopharyngeal, tracheobronchial and systemic immune responses to vaccination and aerosol infection with equine-2 influenza A virus (H3N8). *Proc. Fifth Internat. Conf., Equine Infectious Diseases.* University Press of Kentucky, Lexington 1987, 66-73.
13. *Holmes M. A., Townsend H. G., Hussey S., Breathnach C., Barnett C., Holland R., Lunn D. P.*: Immune responses to commercial equine vaccines. *Int. Vet. Inf. Serv.* 2003, P0630.1103.
14. *Lunn D. P., Hussey S., Sebring R., Rushlow K. E., Radecki S. V., Whitaker-Dowling P., Youngner J. S., Chambers T. M., Holland R. E. Jr., Horohov D. W.*: Safety, efficacy and immunogenicity of a modified-live equine influenza virus vaccine in ponies after induction of exercise-induced immunosuppression. *J. Am. Med. Assoc.* 2001, 218, 900-906.
15. *Lunn D. P., Soboll G., Schram B. R., Quass J., McGregor M. W., Drape R. J., Macklin M. D., McCabe D. E., Swain W. F., Olsen C. W.*: Antibody responses to DNA vaccination of horses using the influenza virus hemagglutinin gene. *Vaccine* 1999, 17, 2245-2258.
16. *Minke J. M., Audonnet J.-Ch., Fischer L.*: Equine viral vaccines: the past, present and future. *Vet. Res.* 2004, 35, 425-443.
17. *Nayak D. P., Tobita K., Janda J. M., Davis A. R., De B. K.*: Homologous interference mediated by defective interfering influenza virus derived from a temperature-sensitive mutant of influenza virus. *J. Virol.* 1978, 28, 375-386.
18. *Neumann G., Fujii K., Kino Y., Kawaoka Y.*: An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implication for vaccine production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 16825-16829.
19. *Neumann G., Kawaoka Y.*: Reverse genetics of influenza virus. *Virology* 2001, 287, 243-250.
20. *Newton J. R., Lakhani K. H., Wood J. L. N., Baker D. J.*: Risk factors for equine influenza serum antibody titres in young thoroughbred racehorses given an inactivated vaccine. *Prev. Vet. Med.* 2000, 46, 129-141.
21. *Olsen Ch. W.*: DNA vaccination against influenza viruses: a review with emphasis on equine and swine influenza. *Vet. Microbiol.* 2000, 74, 149-164.
22. *Olsen Ch. W., McGregor M. W., Dybdahl-Sissoko N., Schram B. R., Nelson K. M., Lunn D. P., Macklin M. D., Swain W. F., Hinshaw V. S.*: Immunogenicity and efficacy of baculovirus-expressed and DNA-based equine influenza virus hemagglutinin vaccines in mice. *Vaccine* 1997, 15, 1149-1156.
23. *Paillot R., Hannant D., Kydd J. H., Daly J. M.*: Vaccination against equine influenza: Quid novi? *Vaccine* 2006, 24, 4047-4061.
24. *Palese P.*: Making better influenza virus vaccines? *Emerg. Infect. Dis.* 2006, 12, 61-65.
25. *Quinlivan M., Zamarin D., Garcia-Satre A., Cullinane A., Chambers T., Palese P.*: Attenuation of equine influenza viruses through truncations of the NS1 protein. *J. Virol.* 2005, 79, 8431-8439.
26. *Soboll G., Horohov D. W., Aldridge B. M., Olsen C. W., McGregor M. W., Drape R. J., Macklin M. D., Swain W. F., Lunn D. P.*: Regional antibody and cellular immune responses to equine influenza virus infection, and particle mediated DNA vaccination. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2003, 94, 47-62.
27. *Soboll G., Nelson K. M., Leuthner E. S., Clark R. J., Drape R., Macklin M. D., Swain W. F., Olsen C. W., Lunn D. P.*: Mucosal co-administration of cholera toxin and influenza virus hemagglutinin-DNA in ponies generates a local IgA response. *Vaccine* 2003, 21, 3081-3092.
28. *Timoney P. J.*: Equine influenza. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 1996, 19, 205-211.

Adres autora: mgr Małgorzata Purzycka, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: malgorzata.purzycka@piwet.pulawy.pl