

Kamila Caraballo Cortés*, Iwona Ośko*, Agnieszka Pawełczyk*, Hanna Berak**, Maria Fic*,
Andrzej Horban**, Marek Radkowski*

ANALIZA PORÓWNAWCZA REGIONU 5'UTR ORAZ HVR1 WIRUSA ZAPALENIA WĄTROBY TYPU C (HCV) W SUROWICY I KOMÓRKACH JEDNOJĄDRZASTYCH KRWI OBWODOWEJ (PBMC) WE WCZESNEJ FAZIE LECZENIA INTERFERONEM I RYBAWIRYNĄ¹

COMPARISON OF 5'UTR AND HVR1 OF HEPATITIS C VIRUS (HCV) IN SERUM AND PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS IN THE EARLY PHASE OF INTERFERON AND RIBAVIRIN TREATMENT

*Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych, Warszawski Uniwersytet Medyczny
**Wojewódzki Szpital Zakaźny w Warszawie

STRESZCZENIE

Zmienność genetyczna jest charakterystyczną właściwością wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV), a zarazem odzwierciedla rodzaj oraz intensywność mechanizmów selekcyjnych działających na ten wirus. Uważa się, że zmienność ta jest w dużym stopniu odpowiedzialna za przewlekły przebieg zakażenia oraz ograniczoną skuteczność leczenia przewlekłego zapalenia wątroby typu C (pwzw C). W pracy przedstawiono wstępne wyniki badań związku między zmiennością genetyczną regionu 5'UTR oraz regionu E2/HVR1 HCV. Porównań sekwencji wirusa dokonano w surowicy krwi oraz komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) u 7 pacjentów przed oraz we wczesnej fazie leczenia pegylovanym interferonem alfa (PEG-IFN- α) oraz rybawiryną.

Analiza SSCP (*single strand conformational polymorphism*) wykazała stabilność genetyczną regionu 5'UTR przed oraz w pierwszych 4 tygodniach leczenia u 6 pacjentów zarówno odpowiadających (SVR+), jak i nieodpowiadających na leczenie (SVR-). Różnica polegająca na pojawieniu się nowych wariantów wystąpiła u 1 pacjenta, który nie odpowiedział na leczenie.

Zmiany regionu E2/HVR1 wystąpiły u wszystkich pacjentów SVR- i miały charakter zmian liczebności wariantów oraz pojawieniu się nowych wariantów genetycznych wirusa. U pacjentów SVR+ zmiany obserwowano w 1 z 3 przypadków i polegały one na redukcji liczby wariantów HCV.

Analiza porównawcza *quasispecies* HCV występujących w surowicy i PBMC wykazała różnice w co najmniej jednym z analizowanych regionów wirusa u wszystkich pacjentów nieodpowiadających na leczenie.

ABSTRACT

Genetic heterogeneity is a characteristic feature of hepatitis C virus (HCV) and it reflects selection mechanisms affecting the virus. It is considered a major factor contributing the viral persistence and drug resistance.

The following work presents the preliminary results of 5'UTR and E2/HVR1 genetic variation analysis and comparison in serum and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of 7 patients before and during the early phase of pegylated interferon alfa (PEG-IFN- α) and ribavirin therapy.

Single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis revealed genetic stability of 5'UTR in all but one patient who did not respond to treatment (SVR-), where new genetic variants appeared. E2/HVR1 genetic changes were characteristic in patients displaying treatment failure (SVR-) and usually reflected fluctuations in complexity and appearance of new genetic HCV variants. Genetic changes (reduction in complexity) were found in one of three sustained virological responders (SVR+ patients).

Comparatory analysis of the HCV *quasispecies* present in serum and PBMC showed differences in at least one analysed region in all non-responders.

Presented results suggest the independent forces driving genetic changes in analysed regions. They also point out the presence of genetic compartmentalization possibly having an impact on antiviral treatment result.

¹ Badania finansowane z projektu MNiSW nr NN 401 337433

Obserwowane wyniki wskazują na niezależność zmian genetycznych HCV zachodzących w obydwu regionach oraz istnienie zjawiska kompartmentalizacji wirusa, co może mieć wpływ na efekt leczenia przeciwwirusowego.

Słowa kluczowe: *HCV, quasispecies, 5'UTR, E2/HVR1, leczenie przeciwwirusowe*

Key words: *HCV, quasispecies, 5'UTR, E2/HVR1, antiviral treatment*

WSTĘP

Wirus zapalenia wątroby typu C (HCV) wywołuje u większości zakażonych osób (50-80%) przewlekłe zapalenie wątroby typu C (pwzw C), które może prowadzić do rozwoju marskości wątroby oraz pierwotnego raka wątroby (HCC); (1).

HCV wykazuje znaczny poziom wariacji genetycznej, będącej konsekwencją niskiej wierności kopiowania HCV RNA przez wirusową RNA-zależną polimerazę RNA, szybkiej replikacji oraz dużej liczebności populacji wirusa w zakażonym organizmie (1). Cechy te determinują występowanie HCV w organizmie pacjenta jako heterogennej i dynamicznie zmieniającej się genetycznie populacji, podlegającej selekcji narzuconej przez środowisko, w szczególności odpowiedzi układu immunologicznego (2).

Aktualnie stosowane standardy leczenia, oparte na stosowaniu PEG-IFN- α oraz rybawiryny, wykazują ograniczoną skuteczność (średnio w 50% przypadków), stąd zwiększenie efektywności leczenia pwzw C jest obecnie jednym z ważnych celów badań naukowych (2).

Na skuteczność leczenia wpływają czynniki zarówno osobnicze, jak i wirusowe. Wykazano, że wiek, płeć, rasa, polimorfizm genów kodujących IFN czy poziom ekspresji genów efektorowych dla interferonu mają wpływ na efekt terapeutyczny (3-5). Udowodniono również znaczenie zmienności regionów HVR1 oraz NS5a w odpowiedzi na leczenie przeciwwirusowe: wysoka zmienność NS5a przed leczeniem prowadziła zazwyczaj do sukcesu terapeutycznego, natomiast wysoka złożoność HVR1 przed leczeniem była związana z niekorzystną prognozą (6-8). Niewiele natomiast wiadomo o ewolucji stabilnych genetycznie regionów wirusa w trakcie leczenia, takich jak region niekodujący 5' (5'UTR).

Przeprowadzone badanie miało na celu analizę zmienności genetycznej regionów 5'UTR oraz E2/HVR1 wirusa wyizolowanego z surowicy oraz PBMC przed oraz w trakcie leczenia przeciwwirusowego PEG-IFN- α oraz rybawiryną w kontekście odpowiedzi na leczenie. Rycina 1 przedstawia organizację genomu HCV z uwzględnieniem analizowanych regionów wirusa.

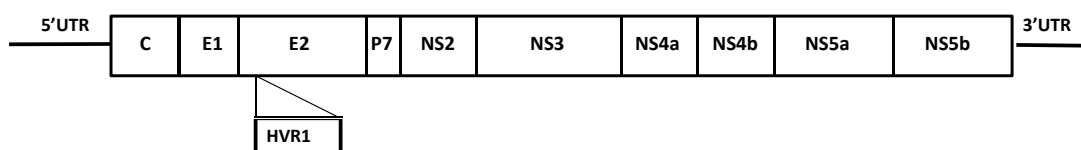
MATERIAŁ I METODY

Badaniem objęto 7 pacjentów zakażonych genotypem 1b HCV leczonych standardowo PEG-IFN- α oraz rybawiryną. Za pacjentów wyleczonych (SVR+) uznano tych, którzy nie wykazali obecności HCV RNA w surowicy krwi 6 miesięcy po zakończeniu leczenia przy użyciu komercyjnego testu PCR (Roche).

Materiał do badań stanowiły próbki surowicy oraz izolowane z krwi pełnej komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC) pobrane 1 dzień przed rozpoczęciem leczenia oraz w 7, 14, 21, 28 dniu leczenia.

Izolacja HCV RNA oraz amplifikacja regionów 5'UTR oraz E2/HVR1 HCV. HCV RNA izolowano z surowicy oraz PBMC wg zmodyfikowanej metody Chomczyńskiego z użyciem odczynnika Trizol (Invitrogen). Sekwencje 5'UTR oraz E2/HVR1 HCV amplifikowano przy użyciu techniki RT PCR opisaną uprzednio (9).

Analiza quasispecies regionów 5'UTR oraz E2/HVR1 HCV metodą SSCP. Metodą SSCP opisaną wcześniej (10) przeprowadzono charakterystykę molekularną wariantów genetycznych regionów 5'UTR oraz E2/HVR1 wirusa pochodzącego z surowicy krwi oraz PBMC przed oraz we wczesnej fazie leczenia (do 4 tygodni). Złożoność populacji *quasispecies* określono na podstawie liczby wariantów w danym punkcie czasowym. Ewolucję *quasispecies* określono na podstawie



Ryc. 1. Schemat genomu HCV

Fig. 1. HCV genome organisation

zmian w złożoności populacji i/lub zmian o charakterze przesunięcia prążka (pojawienie się nowych wariantów genetycznych) w badanych punktach czasowych.

WYNIKI

W oparciu o wyniki standardowej oceny skuteczności leczenia, trzech pacjentów zakwalifikowano do grupy SVR+, czterech do SVR-.

Produkt amplifikacji regionu 5'UTR uzyskano w 42 z 70 (60%) analizowanych próbek, z czego 20 (29%) w surowicy krwi oraz 22 w PBMC (31%). Produkt amplifikacji regionu E2/HVR1 uzyskano w 34 z 70 (49%) analizowanych próbek, z czego 19 (27%) w surowicy krwi oraz 15 w PBMC (21%).

Wszyscy badani pacjenci wykazali obecność co najmniej 2 wariantów genetycznych regionu 5'UTR oraz E2/HVR1 w każdym z analizowanych produktów amplifikacji, zarówno w surowicy, jak i PBMC. Średnia liczba wariantów przed leczeniem wynosiła odpowiednio 4 oraz 8 dla regionów 5'UTR oraz E2/HVR1.

Analiza SSCP wykazała, że region 5'UTR był stabilny w badanych punktach czasowych zarówno u pacjentów odpowiadających, jak i nieodpowiadających na leczenie, z wyjątkiem jednego pacjenta SVR-, u którego pojawił się nowy wariant HCV (tab. I).

Region E2/HVR1 wykazał dużo większą niestabilność genetyczną. Zmiany wystąpiły u wszystkich pacjentów SVR- i polegały one na różnicach w złożoności populacji (4 pacjentów) oraz pojawieniu się nowych wariantów genetycznych (2 pacjentów). Natomiast w grupie SVR+ populacja wirusa wykazała zmiany

Tabela I. Wyniki analizy SSCP *quasispecies* regionu 5'UTR oraz HVR1 u pacjentów SVR- i SVR+

Table I. SSCP analysis of 5'UTR and HVR1 *quasispecies* of SVR- and SVR+ patients

	Pacjenci SVR- (n=4)	Pacjenci SVR+ (n=3)	Razem
5'UTR zmiany <i>quasispecies</i>	1/4	0/3	1/7
HVR1 zmiany <i>quasispecies</i>	4/4	1/3	5/7

Tabela II. Porównanie *quasispecies* sekwencji 5'UTR oraz HVR1 HCV pomiędzy surowicą a PBMC u pacjentów SVR- i SVR+

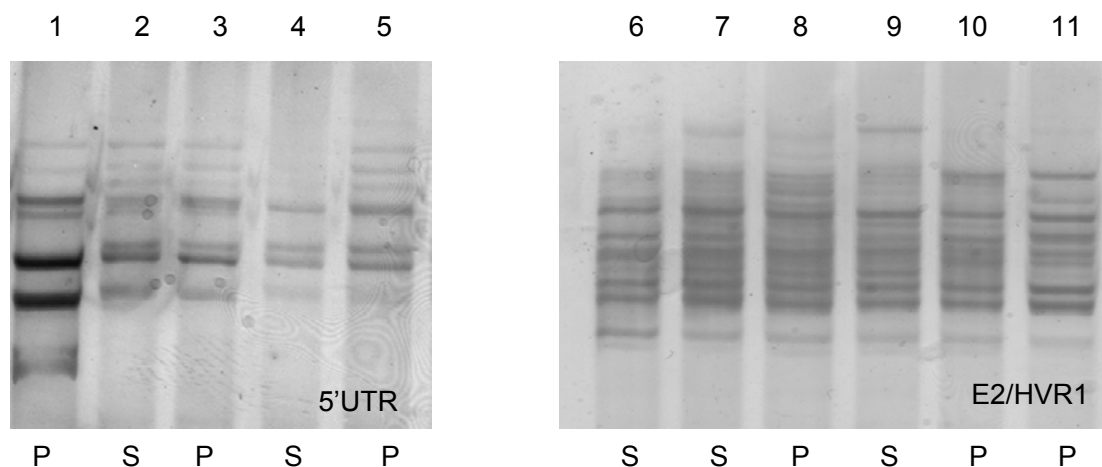
Table II. Comparison of 5'UTR oraz HVR1 *quasispecies* sequences between serum and PBMC of SVR- and SVR+ patients

Różnice surowica/PBMC	Pacjenci SVR- (n=4)	Pacjenci SVR+ (n=3)	Razem
5'UTR różnice	2/4	0/3	2/7
HVR1 różnice	3/4	0/3	3/7
5'UTR i/lub HVR1 różnice	4/4	0/3	4/7

w złożoności (redukcja) w 1 z 3 przypadków. Rycina 2 przedstawia porównanie zmian genetycznych obu regionów dokonane techniką SSCP.

Porównano również warianty HCV amplifikowane z surowicy oraz PBMC w obu analizowanych regionach (tab. II). Różnice *quasispecies* wirusa pomiędzy surowicą a PBMC obserwowano u 2 z 7 pacjentów w regionie 5'UTR oraz u 3 z 7 pacjentów w regionie E2/HVR1.

U wszystkich pacjentów nieodpowiadających na leczenie (SVR-), czyli czterech, wystąpiły różnice



Ryc. 2. Porównanie zmian genetycznych regionów 5'UTR oraz HVR1 HCV u pacjenta leczonego przeciwwirusowo
Fig. 2. Comparison of 5'UTR and HVR1 HCV genetic changes of patient undergoing antiviral therapy

1 - Dzień przed leczeniem; 2, 3 - 7 dzień leczenia; 4, 5 - 14 dzień leczenia

6 - Dzień przed leczeniem; 7, 8 - 7 dzień leczenia; 9, 10 - 14 dzień leczenia; 11 - 21 dzień leczenia

S - surowica; P - komórki jednojądrzaste krwi obwodowej

w kompozycji *quasispecies* między PBMC a surowicą (kompartmentalizacja) w przynajmniej jednym z analizowanych regionów, natomiast u żadnego pacjenta odpowiadającego na leczenie nie wykazano różnic między kompartmentami w żadnym z analizowanych regionów.

DYSKUSJA

Spośród licznych czynników osobniczych i wirusowych uważanych obecnie za odpowiadające za skuteczność leczenia przeciwwirusowego, duża zmienność genetyczna HCV jest wymieniana najczęściej (1, 6-8). Podjęto zatem próby określenia związku pomiędzy zmiennością genetyczną najbardziej niestabilnych regionów genomu wirusa (E2/HVR1, NS5a) a wynikiem leczenia. Wyniki tych badań wskazywały na znaczenie polimorfizmu tych regionów we wrażliwości na IFN- α (6, 11-13). Ewolucja genetyczna stabilnych regionów wirusa takich jak region niekodujący 5' (5'UTR) w trakcie leczenia i jej wpływ na efekt terapeutyczny są poznane znacznie słabiej (12).

W ostatnich latach w wielu publikacjach informowano o występowaniu pozawątrobowej replikacji wirusa u pacjentów przewlekle zakażonych HCV (14-16).

Obecność pośredniego produktu replikacji HCV wykryto w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC), komórkach gleju oraz narządach wydzielania wewnętrznego (14-16). Dane literaturowe wskazują, że pojawianie się wirusa w PBMC i surowicy nie jest równoczesne (17). Zakażenie PBMC jest stosunkowo rzadkie w fazie ostrej choroby, natomiast jest ono często obserwowane w fazie przewlekłej oraz po leczeniu. Wydaje się, że obecność wirusa w PBMC ma szczególne znaczenie dla unikania odpowiedzi immunologicznej i może przyczynić się do nawrotu zakażenia po leczeniu (14). Nadal jednak mało wiadomo na temat związku zakażenia PBMC z naturalnym przebiegiem zakażenia i wynikiem leczenia.

Kompartmentalizacja genetyczna wirusa jest zjawiskiem polegającym na obecności zróżnicowanych genetycznie populacji w różnych miejscach występowania wirusa (18, 19). I tak, opisano warianty genetyczne HCV specyficzne dla monocytów i limfocytów B cechujące się określoną sekwencją E2/HVR1 (20). Kompartmentalizację stwierdzono również na podstawie analizy regionu 5'UTR (21).

Przedstawione wstępne wyniki badania, które polegało na analizie porównawczej regionu 5'UTR oraz E2/HVR1 wirusa z surowicy i PBMC pacjentów przed i w wczesnej fazie leczenia PEG-IFN- α oraz rybawiryną, potwierdziły wysoką stabilność regionu 5'UTR. Jest to warunkiem utrzymania prawidłowej struktury przestrzennej regionu IRES (*internal ribosomal entry site*),

odpowiedzialnego za replikację i translację białek wirusowych. Niska złożoność *quasispecies* w 5'UTR (średnio 4 warianty przed leczeniem) również wskazuje na ograniczenia konformacyjne regionu, w którym zmiany mogą doprowadzić do potencjalnie niekorzystnych dla wirusa modyfikacji funkcji replikacji i translacji (18).

Znaczna niestabilność genetyczna regionu E2/HVR1, którą obserwowano u większości badanych pacjentów może świadczyć o dużej presji immunologicznej wywieranej na wirus w czasie leczenia. Odpowiedzią na nią są zmiany mutacyjne w obrębie HVR1 wpływające na zmienność antygenową białka otoczki wirusa, a w efekcie na unikanie odpowiedzi odpornościowej.

Duża złożoność *quasispecies* (średnio 8 wariantów) tego regionu przed leczeniem świadczy o tolerancji mutacji, które są ewolucyjnie korzystne, zwiększając szanse wirusa na pozytywną selekcję w warunkach presji układu immunologicznego, zwłaszcza w czasie leczenia przeciwwirusowego.

Niezależność zmian genetycznych analizowanych regionów wirusa wskazuje na odmienną mechanizmów patogenetycznych warunkujących proces zmienności: regionu 5'UTR – właściwości replikacyjne HCV, regionu E2/HVR1 – podatność na mechanizmy odpowiedzi immunologicznej pacjenta.

Różnice, które wystąpiły w składzie *quasispecies* HCV pomiędzy surowicą a PBMC u 2 z 7 pacjentów w regionie 5'UTR mogą wskazywać na to, że mutacje w obrębie struktury IRES determinują tropizm wirusa, a w efekcie ustalanie się różnych populacji w analizowanych kompartmentach. U badanych pacjentów wiązało się to z negatywnym efektem leczenia.

W badaniu odnotowano obecność odmiennych genetycznie populacji w PBMC u 3 z 7 pacjentów w regionie E2/HVR1, co wiązało się z niekorzystnym efektem leczenia u tych pacjentów. Można wnioskować, że zaobserwowane różnice genetyczne mogą być wynikiem preferencyjnego zakażenia komórek układu immunologicznego przez niektóre szczepy wirusa, prawdopodobnie z powodu oddziaływania białek otoczki tych wariantów z receptorami „wejścia” na powierzchni komórek.

Stosunkowo niedawno wykazano istnienie odpowiedzi cytotoksycznych limfocytów T skierowanych przeciwko tym genotypom HCV, które nie występowały wówczas w surowicy pacjentów. Wyniki te sugerują, że mogła to być odpowiedź przeciwko „nizowym” szczepom wirusa obecnym w szczególnych kompartmentach, lub też wcześniej obecnym, lecz wyeliminowanym genotypom (22). Tego rodzaju odpowiedź może spowodować dynamikę genetyczną wirusa w PBMC.

Wykazano, że u wszystkich pacjentów, którzy nie uzyskali statusu SVR istniały różnice między populacjami *quasispecies* występującymi w surowicy i PBMC

w co najmniej jednym z analizowanych regionów wirusa. Wyniki te wskazują, że leczenie może być nieskuteczne u pacjentów, którzy wykazują taką kompartmentalizację HCV. Odmienne populacje w PBMC mogą świadczyć o obecności lekoopornych wariantów w komórkach i ich przetrwaniu w czasie leczenia.

Choć uzyskane wyniki mają charakter wstępny, mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia zjawiska zmienności wirusa we wczesnej fazie leczenia oraz niezależnej replikacji HCV w komórkach układu immunologicznego i jej wpływu na skuteczność leczenia. Stwierdzenie jakości tych zmian w analizowanych regionach wirusa w kontekście skuteczności leczenia wymaga dalszych analiz, prowadzonych z udziałem większej grupy pacjentów.

PODSUMOWANIE

Porównanie *quasispecies* występujących w surowicy i PBMC wykazało różnice w co najmniej jednym z analizowanych regionów wirusa (5'UTR i/lub E2/HVR1) u wszystkich pacjentów nieodpowiadających na leczenie. Wyniki te wskazują na niezależność zmian genetycznych HCV zachodzących w obydwu regionach, co ma wpływ na efekt leczenia przeciwwirusowego. Badanie tego zjawiska mogłoby stać się narzędziem wspierającym leczenie.

PIŚMIENNICTWO

1. Duarte EA, Novella IS, Weaver SC, et al. RNA virus quasispecies: significance for viral disease and epidemiology. *Infect Agents Dis* 1994;3(4):201-14.
2. Pawlotsky JM. Hepatitis C virus population dynamics during infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;299:261-84.
3. McHutchison JG, Poynard T, Pianko S, et al. The impact of interferon plus ribavirin on response to therapy in black patients with chronic hepatitis C. The International Hepatitis Interventional Therapy Group. *Gastroenterology* 2000;119(5):1317-23.
4. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009;461(7262):399-401.
5. Younossi ZM, Baranova A, Afendy A, et al. Early gene expression profiles of patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon-alfa and ribavirin. *Hepatology* 2009;49(3):763-74.
6. Farci P, Strazzeri R, Alter HJ, et al. Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(5):3081-6.
7. Pawlotsky JM, Germanidis G, Neumann AU, Pellerin M, Frainais PO, Dhumeaux D. Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J Virol* 1998;72(4):2795-805.
8. Sarrazin C, Herrmann E, Bruch K, Zeuzem S. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein and interferon resistance: a new model for testing the reliability of mutational analyses. *J Virol* 2002;76(21):11079-90.
9. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Nowicki M, Rakela J. Uneven distribution of hepatitis C virus quasispecies in tissues from subjects with end-stage liver disease: confounding effect of viral adsorption and mounting evidence for the presence of low-level extrahepatic replication. *J Virol* 2000;74(2):1014-7.
10. Laskus T, Wilkinson J, Gallegos-Orozco JF, et al. Analysis of hepatitis C virus quasispecies transmission and evolution in patients infected through blood transfusion. *Gastroenterology* 2004;127(3):764-76.
11. Pawlotsky JM, Germanidis G, Frainais PO, et al. Evolution of the hepatitis C virus second envelope protein hypervariable region in chronically infected patients receiving alpha interferon therapy. *J Virol* 1999;73(8):6490-9.
12. Torres-Puente M, Cuevas JM, Jimenez-Hernandez N, et al. Genetic variability in hepatitis C virus and its role in antiviral treatment response. *J Viral Hepat* 2008;15(3):188-99.
13. Chambers TJ, Fan X, Droll DA, et al. Quasispecies heterogeneity within the E1/E2 region as a pretreatment variable during pegylated interferon therapy of chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005;79(5):3071-83.
14. Muller HM, Pfaff E, Goeser T, Kallinowski B, Solbach C, Theilmann L. Peripheral blood leukocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication. *J Gen Virol* 1993;74 (Pt 4):669-76.
15. Radkowski M, Wilkinson J, Nowicki M, et al. Search for hepatitis C virus negative-strand RNA sequences and analysis of viral sequences in the central nervous system: evidence of replication. *J Virol* 2002;76(2):600-8.
16. Laskus T, Radkowski M, Piasek A, et al. Hepatitis C virus in lymphoid cells of patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1: evidence of active replication in monocytes/macrophages and lymphocytes. *J Infect Dis* 2000;181(2):442-8.
17. Chang TT, Young KC, Yang YJ, Lei HY, Wu HL. Hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells: comparing acute and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1996;23(5):977-81.
18. Roque-Afonso AM, Ducoulombier D, Di Liberto G, et al. Compartmentalization of hepatitis C virus genotypes between plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 2005;79(10):6349-57.
19. Forton DM, Karayiannis P, Mahmud N, Taylor-Robinson SD, Thomas HC. Identification of unique hepatitis C virus quasispecies in the central nervous system and comparative analysis of internal translational efficiency of brain, liver, and serum variants. *J Virol* 2004;78(10):5170-83.
20. Lerat H, Berby F, Traub MA, et al. Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. *J Clin Invest* 1996;97(3):845-51.
21. Laskus T, Radkowski M, Bednarska A, et al. Detection and analysis of hepatitis C virus sequences in cerebrospinal fluid. *J Virol* 2002;76(19):10064-8.

22. Sugimoto K, Kaplan DE, Ikeda F, et al. Strain-specific T-cell suppression and protective immunity in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005;79(11):6976-83.

Otrzymano: 31.01.2011 r.

Zaakceptowano do druku: 8.03.2011 r.

Adres do korespondencji:

Mgr Kamila Caraballo Cortés
Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych
i Pasożytniczych
Warszawski Uniwersytet Medyczny
Ul. Pawińskiego 3c
02-106 Warszawa
tel. (22) 57 20 709,
e-mail: kamila.caraballo@wum.edu.pl