

DISTRIBUCION DE LOS GENOTIPOS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN UNA POBLACION ARGENTINA DE DROGADICTOS ENDOVENOSOS

JORGE A. FINDOR¹, JUAN A. SORDA¹, JORGE DARUICH¹, ESTELA BRUCH IGARTUA¹, ESTELA MANERO¹, ALEJANDRA AVAGNINA², DANIELA BENBASSAT¹, JORGE REY³, MONICA NAKATSUNO³

¹ División de Gastroenterología, ² Departamento de Patología, ³ División de Hemoterapia, Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires,

Resumen El antecedente de drogadicción endovenosa constituye un factor de riesgo poco frecuente en pacientes (pts) con infección crónica por el virus C (HCV) en la Argentina, representando en nuestro servicio menos del 10%. Nos propusimos determinar la prevalencia de los diferentes genotipos (Gt) del HCV en un grupo de pts con hepatitis crónica por HCV con antecedentes de drogadicción endovenosa. Un total de 68 pts con antecedentes de drogadicción endovenosa y hepatitis crónica HCV fueron comparados con 68 pts de igual edad y sexo pero sin el antecedente de drogadicción. La biopsia hepática fue realizada en todos los pts. La genotipificación del HCV fue efectuada por INNO LiPA (Innogenetics). Para el análisis estadístico se empleó el test de Student. La edad media en ambos grupos fue de 35 ± 7.8 años correspondiendo 50 pts al sexo masculino. No se observaron diferencias entre ambos grupos en la prevalencia de los GT 1a, 2a/c e infecciones mixtas. El Gt 1b fue más frecuente en el grupo control 26/68 (38,2%) que en el de drogadictos 13/68 (19.1%) ($p = 0.0228$). También fue observada una diferente prevalencia en el GT3, presente en 29/68 (42.6%) de los pts drogadictos y en 8/68 (11.8%) del grupo control ($p = 0.0001$). El Gt1a fue el segundo más frecuente en el grupo con antecedentes de drogadicción 18/68 (26.5%). La infección simultánea con el HIV fue observada en 8 pts con antecedentes de drogadicción y en ninguno del grupo control. La biopsia hepática mostró una mayor prevalencia de lesiones leves en el grupo control 39/68 (57.3%) que en los pts con antecedentes de drogadicción 22/68 (32.4%) ($p = 0.0058$). En los pts infectados con el Gt3 la hepatitis crónica severa y cirrosis fueron más frecuentes en los pts con antecedentes de drogadicción. Se concluye que en nuestro medio el Gt 3 es el más prevalente en los pts con antecedentes de drogadicción endovenosa. Las formas de hepatitis leves son menos frecuentes en los pts con antecedentes de drogadicción. A pesar del pequeño número de pts coinfectados con el HIV es importante notar que el 25% de ellos presentaron hepatitis crónica severa o cirrosis.

Abstract *HCV genotypes in intravenous drug addicts in a cohort of Argentine patients.* Intravenous drug addiction (IVD) is an uninfrequent risk factor in Argentina, representing less than 10% of patients (pts) with chronic HCV infection seen in our Unit. In order to study the genotypes (Gt) in IVD and compare them with a non drug addicted control population, 68 pts with a history of IVD were enrolled in this study and compared with 68 non drug addict (NDA) pts with chronic HCV, with similar age and gender distribution. In all pts a liver biopsy was performed. Genotyping was done by INNO LiPA (Innogenetics, Belgium). Mean age in both groups was 35 ± 7.8 years and 50 were males. No difference was observed between both groups in the prevalence of Gt1a, Gt2a/c and in those with mixed infections. The prevalence of Gt1b in IVD was 19.1% and in NDA 38.2% ($p = 0.0228$). A highly significant difference was also observed in the prevalence of Gt3a, of 42.6% in IVD and only 11.8% in NDA ($p = 0.0001$). Gt1a was the second most frequent genotype in IVD pts (26.5%). Simultaneous HIV infection was present in 8 IVD pts (11.8%) and in none of NDA group. Liver biopsies showed a higher prevalence of mild chronic hepatitis in NDA (57.3%) than in IVD (32.4%) ($p = 0.0058$). Severe chronic hepatitis with advanced fibrosis or cirrhosis was more frequent in the Gt3 of the group with IVD when compared with Gt3 of the NDA group. It can be concluded that in accordance with other geographical areas, Gt3a is far more prevalent in intravenous drug addicts than in the general population in Argentina where Gt1b is more frequent. Mild forms of chronic hepatitis are less frequent in IVD. In spite of the relatively small group with HCV co-infection with HIV, it seems important to note that 2/8 (25%) showed severe hepatitis C or cirrhosis.

Key words: chronic hepatitis C, HCV genotypes, intravenous drug addicts

El virus de la hepatitis C se presenta como una población viral heterogénea que ha sido clasificada, basado

sobre el análisis de la secuencia de los nucleótidos de su genoma, dentro de seis genotipos mayores y algunos subtipos¹.

Estos genotipos presentan una distribución mundial variable y aunque aún no está establecido sí podrían tener relevancia en la vía de transmisión^{2,3}. Si ha sido demostrado que se asocian con relativa mayor frecuencia a ciertas fuentes de contagio presentes en grupos de

Recibido: 27-VII-1998

Aceptado: 29-XII-1998

Dirección postal: Dr. Juan Sordá, José Mármol 3357, 1602 Pcia Buenos Aires, Argentina
Fax: 54-1-4963-8300

riesgo como hemofílicos, hemodializados, drogadictos, etc. Por otra parte han adquirido en los últimos años una mayor relevancia clínica y epidemiológica no solamente por el impacto que podrían tener sobre la historia natural de la enfermedad y como predictores de respuesta al tratamiento con interferón, sino también como una ayuda para identificar la fuente de la infección^{4, 5}.

Nuestro grupo ha comunicado previamente una prevalencia del genotipo 1, en pacientes con hepatitis crónica por HCV, en alrededor del 60% y de los subtipos 1a y 1b en el 16.9 y en el 41.1% respectivamente⁶. Otros autores nacionales, estudiando pacientes portadores crónicos del HCV, obtuvieron resultados similares encontrando el genotipo 1 en el 70.7%⁷. En los EE.UU. los genotipos 1a y 1b constituyen casi el 70% del total de las infecciones por el HCV⁸. En Europa el genotipo 1b también es el más prevalente siendo mayor en los países del Mediterráneo^{9, 10}, aunque no alcanza a la registrada en el Japón cercana al 70%³.

Los drogadictos endovenosos constituyen una población de alto riesgo para contraer la infección por el HCV¹¹. Recientes comunicaciones de algunas áreas geográficas, especialmente en Europa, han mostrado una mayor prevalencia del genotipo 3 en aquellos pacientes con antecedentes de drogadicción endovenosa^{9, 10, 12, 13, 14, 15}. También se ha identificado en este grupo de enfermos una mayor frecuencia de infecciones mixtas por varios genotipos¹⁵. Estos hallazgos no han sido comprobados en otros estudios epidemiológicos como en los EE.UU.⁸ o en algunos países asiáticos¹⁶ donde el genotipo 1 es el más prevalente.

Estas variaciones geográficas podrían estar relacionadas con la propagación regional de la infección y con la introducción de nuevos genotipos como ha sido recientemente comunicado con el genotipo 4, identificado inicialmente como el de mayor prevalencia en Medio Oriente, en un grupo de drogadictos endovenosos en el sur de España¹⁷.

Las comunicaciones sobre la prevalencia de los diferentes genotipos de la hepatitis C en drogadictos endovenosos en nuestro país son aún escasas^{7, 18}.

El propósito del presente estudio es el de determinar la prevalencia de los diferentes genotipos del HCV y su repercusión en el daño histológico, en pacientes con hepatitis crónica por virus de la hepatitis C con antecedentes de drogadicción endovenosa, comparándolos con un grupo control apareado de similar edad y sexo pero sin el antecedente de drogadicción.

Material y métodos

De una población total de 780 pacientes con diagnóstico de hepatitis crónica por infección por el virus de la hepatitis C (HCV) vistas consecutivamente en la División de Gastroenterología de nuestro Hospital en el transcurso de los años 1992

a 1997, se seleccionaron 68 con antecedentes de drogadicción endovenosa actual o pasada. Este grupo de enfermos fue comparado con un grupo apareado de igual edad y sexo, todos ellos también portadores de infección crónica por el HCV, pero sin el antecedente de drogadicción endovenosa.

Sólo se incluyeron pacientes con biopsia hepática. El resultado histológico fue evaluado mediante el "score" de Knodell¹⁹ clasificándose a las lesiones de hepatitis crónica en leves, moderadas, severas y cirrosis. La infección por HCV fue certificada por la determinación de anticuerpos IgG HCV por el método de ELISA (Abbott) en por lo menos dos muestras con un intervalo no menor de 2 meses entre cada una. La viremia del HCV RNA fue determinada mediante la transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la genotipificación del virus mediante LiPA (Inno LiPA 2.0, Innogenetics). Las muestras de sangre fueron extraídas en ayunas sin anticoagulante. El suero fue separado dentro de las 4 horas posteriores a la extracción y congelado a -20°C hasta el momento de su procesamiento. Para la determinación de los anticuerpos anti HIV se empleó la técnica de ELISA y para la confirmación se utilizó el Western blotting.

La evaluación estadística se realizó mediante el test de Student.

Resultados

Ambos grupos eran conformados por 50 hombres y 18 mujeres con una edad media de 35 ± 7.8 años.

La distribución de los genotipos y subtipos en ambos grupos se detalla en la Tabla 1. En la misma se observa un predominio altamente significativo ($p = 0.0001$) en la prevalencia del genotipo 3 en el grupo de pacientes con antecedentes de drogadicción, mientras que la prevalencia del subtipo 1b es mayor en el grupo control. El segundo genotipo en frecuencia en el grupo de drogadicción es el subtipo 1a mientras que la distribución de los otros genotipos no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

No se observó en la población estudiada diferencias en la edad entre los diferentes genotipos (Tabla 2).

Tampoco se constató diferencia entre los genotipos de ambos grupos estudiados. Aunque el genotipo 3 mues-

TABLA 1.— Prevalencia de los genotipos y subtipos del HCV en ambos grupos

Genotipo	DEV (n=68) %	Control (n=68) %	p
1a	18 26.5	21 30.9	0.7045
1b	13 19.1	26 38.2	0.0228
2	6 8.8	11 16.1	0.2996
3	29 42.6	8 11.8	0.0001
4	2 3	0	0.4962
Infecciones mixtas	0	2 3	0.4962

DEV = Pacientes con antecedentes de drogadicción endovenosa

TABLA 2.- Relación entre la edad y los genotipos más frecuentes entre el grupo con antecedentes de drogadicción vs el grupo control

Genotipo	DEV Edad media ± SD	Control Edad media ± SD	p
1a	35.2 ± 6.1	32.4 ± 6.4	0.1692
1b	35.4 ± 9.2	36.1 ± 7.1	0.8008
2	36.9 ± 9	40.6 ± 9.4	0.4838
3	33.9 ± 8.1	33.6 ± 3.4	0.7021

TABLA 3.- Relación entre la edad y los genotipos más frecuentes en el grupo con antecedentes de drogadicción

Genotipos	p
1a vs 1b	35.2 ± 6.1 vs 35.4 ± 9.2 0.9485
1a vs 2	35.2 ± 6.1 vs 36.9 ± 9 0.6261
1b vs 2	35.4 ± 9.2 vs 36.9 ± 9 0.7555
2 vs 3	36.9 ± 9 vs 33.9 ± 8.1 0.4358
1a vs 3	35.2 ± 6.1 vs 33.9 ± 8.1 0.5603
1 b vs 3	35.4 ± 9.2 vs 33.9 ± 8.1 0.6010

TABLA 4.- Relación entre la edad y los genotipos más frecuentes en el grupo control

Genotipos	P
1a vs 1b	32.4 ± 6.4 vs 36.1 ± 7.1 0.0711
1a vs 2	32.4 ± 6.4 vs 40.6 ± 9.4 0.1541
1b vs 2	36.1 ± 7.1 vs 40.6 ± 9.4 0.1448
2 vs 3	40.6 ± 9.4 vs 33.6 ± 3.4 0.1847
1a vs 3	32.4 ± 6.4 vs 33.6 ± 3.4 0.6113
1b vs 3	36.1 ± 7.1 vs 33.6 ± 3.4 0.3565

tra una tendencia a presentar una edad menor esta diferencia no alcanza significación estadística (Tablas 3 y 4).

La distribución de la lesión histopatológica y su relación con los genotipos en ambos grupos se detallan en la Tabla 5.

Hubo un predominio de hepatitis crónicas leves en pacientes con genotipo 3 en el grupo carente del antecedente de drogadicción ($p = 0.0041$), no siendo las diferencias significativas entre los otros genotipos o subtipos. El 31% de los pacientes drogadictos con Gt 3 mostraron en el examen histológico hepatitis crónica con severa fibrosis y/o cirrosis. Ninguno del grupo control mostró lesiones histológicas de similar severidad.

TABLA 5.- Distribución de la lesión histopatológica entre los diferentes genotipos

Genotipo	DEV	%	Control	%	p
1a	N = 18		N = 21		
Leve	7	39	14	66.7	0.1577
Moderada	7	39	5	23.8	0.5033
Severa	3	16.6	2	9.5	0.6465
Cirrosis	1	5.6	0	0	0.0892
1b	N = 13		N = 26		
Leve	7	53.8	13	50	0.9098
Moderada	4	30.8	8	30.8	1
Severa	1	7.7	2	7.7	1
Cirrosis	1	7.7	3	11.5	1
2	N = 6		N = 11		
Leve	2	33.3	6	54.5	0.6199
Moderada	3	50	4	36.4	0.6436
Severa	0	0	0	0	1
Cirrosis	1	16.7	1	9.1	1
3	N = 29		N = 8		
Leve	5	17.2	6	75	0.0041
Moderada	15	51.8	2	25	0.2455
Severa	5	17.2	0	0	0.5640
Cirrosis	4	13.8	0	0	0.5573

TABLA 6.- Comparación de la lesión histológica entre ambos grupos

	DEV	%	Control	%	P
Leve	22	32.4	39	57.3	0.0058
Moderada	30	44.1	19	28	0.0740
Severa	9	13.2	4	5.9	0.2433
Cirrosis	7	10.3	6	8.8	1

TABLA 7.- Distribución de los 8 pacientes HIV positivos en genotipos HCV y lesión histológica

Lesión histológica	Genotipos				Total
	1a	1b	2	3	
Leve	2	0	1	1	4
Moderada	0	0	0	2	2
Severa	0	0	0	1	1
Cirrosis	0	0	0	1	1

La comparación del total de diagnósticos histopatológicos entre ambos grupos se detalla en la tabla 6.

De esta tabla surge un predominio de lesiones leves en el grupo sin antecedentes de drogadicción endovenosa ($p = 0.0058$).

Ocho pacientes fueron positivos para el HIV presentando todos ellos antecedentes de drogadicción. Ninguno de estos enfermos tenían evidencias clínicas de inmunodepresión.

En la Tabla 7 se detalla la relación entre el genotipo y la lesión histológica de los 8 pacientes HIV positivos.

Discusión

Nuestros resultados permiten comprobar que en los pacientes con hepatitis crónica por HCV y antecedentes de drogadicción endovenosa los genotipos predominantes en nuestro medio son el 3 con un 42.6% y el 1a con el 26.5%. Estos resultados concuerdan con lo observado en casuísticas europeas como la de Berlín donde este genotipo fue hallado en el 44%¹³, en Eslovenia en el 45.9%¹² y en el Benelux en el 45%⁹. En Escocia el tipo 3 también era el más común en pacientes jóvenes y con historia de drogadicción endovenosa¹⁰. Con relación a la prevalencia de los otros genotipos como el 1b e infecciones mixtas no hemos encontrado diferencias al comparar a los pacientes drogadictos con el grupo control. El genotipo 2 presente en un 8.8% fue superior a lo observado por otros autores en nuestro medio¹⁸. Tanto en Francia como en Italia los drogadictos endovenosos se hallan más frecuentemente infectados por genotipos distintos al 1b, en particular el 1a y el 3a^{4,20,21}. Esto también se observó en la presente casuística donde el subtipo 1a fue el segundo en frecuencia después del genotipo 3 en el grupo con antecedentes de drogadicción. En los pacientes sin el antecedente de drogadicción el genotipo 1b resultó el más prevalente a pesar de tener este grupo, por la metodología de selección, una edad inferior a la observada en nuestro medio en la población general de infectados por el HCV⁶. No existe una explicación clara del porqué de esas diferencias. Se podría especular que la mayor prevalencia relativa del genotipo 3 en los enfermos con antecedentes de drogadicción endovenosa reflejaría la introducción de un nuevo genotipo en nuestro medio y a la propagación más reciente del mismo en este grupo de pacientes, al igual que lo observado con otros genotipos en otras comunidades¹⁷. Podría además existir una estrecha relación entre este genotipo y la vía de transmisión⁴. En otras áreas geográficas se ha observado una disminución con el transcurso del tiempo de la prevalencia de otros genotipos. En este aspecto, cuando se considera a los pacientes con antecedentes transfusionales o hemo-dializados, se ha demostrado un descenso en la prevalencia relativa del genotipo 1b de

aproximadamente un 60% en los últimos 20 años²². En base a estas observaciones y a los resultados de recientes estudios epidemiológicos se han sugerido dos vías de transmisión asociadas^{5,22}. Una de ellas es la que afectaría a personas con antecedentes transfusionales o sin factores de riesgo conocidos y en quienes probablemente la infección fue adquirida hace 30 años o más y en los que predomina el genotipo 1b. La segunda sería más reciente, de no más de 15 años, transmitida por la población de drogadictos endovenosos y en los que predomina el genotipo 3^{22,23,24}. Esta última observación podría ser aplicada a nuestro medio en donde la drogadicción endovenosa no era tan frecuente hace 20 años como lo es ahora.

A pesar de lo hallado por algunos investigadores¹⁵ no pudimos comprobar en el presente estudio un predominio de infección mixta en el grupo de enfermos con antecedentes de drogadicción endovenosa como hubiera sido de esperar, teniendo en cuenta el significativo número de infecciones mixtas halladas en población general de infectados por el HCV en un estudio de nuestro medio²⁵. Contrariamente a lo hallado por otros autores^{9,26} no hemos comprobado en la presente casuística una edad menor en los pacientes infectados con el genotipo 3 en comparación con los infectados con otros genotipos. Ello puede obedecer al hecho que ambos grupos tienen una menor edad a la observada en la población global con infección crónica por el HCV.

La implicancia clínica y la severidad del daño histológico ocasionado por los diferentes genotipos constituyen un área aún no del todo aclarada. Se ha comunicado que los pacientes infectados por el genotipo 1b, contrariamente a aquellos con genotipos distintos al 1b, suelen tener un índice más elevado en el "score" de Knodell, un curso clínico más agresivo y una menor respuesta terapéutica al interferón^{5,23,24,27,28}. En comparación con los portadores de otros genotipos estos pacientes suelen presentar mayor edad y una enfermedad de más larga duración. El genotipo 1b también ha sido hallado más frecuentemente en la enfermedad hepática descompensada y en aquellos pacientes que se encuentran a la espera de un trasplante hepático y en los portadores de hepatocarcinoma^{5,29}. La interpretación de estos hallazgos podría estar relacionada no solamente a una mayor duración de la infección sino también a propiedades biológicas intrínsecas del propio genotipo^{5,24}. Por otra parte los pacientes coinfectados con el HIV, circunstancia observada frecuentemente en los enfermos drogadictos endovenosos, presentan una mayor actividad necroinflamatoria y fibrosis^{30,31}. Estos enfermos tienen un alto riesgo de evolucionar a la cirrosis en un período de tiempo más corto que aquellos sin infección con el HIV³⁰. Aunque los factores que determinan esta más rápida evolución son desconocidos un hecho de importancia para considerar es el incremento en los niveles

del HCV RNA observado en pacientes coinfectados con el HIV³¹. Por otra parte no está claro aún si la inmunosupresión podría causar la generación de múltiples variantes genómicas (cuasiespecies) lo que le permitiría al virus escapar de la presión del sistema inmune del huésped facilitando de esta manera la infección crónica. También un alto grado de variabilidad se correlaciona con una menor respuesta a la terapéutica con interferón. La prevalencia del HIV en la población estudiada de drogadictos en esta serie, cercana al 12%, resultó ser inferior a la observada en otras áreas geográficas como en España donde la coinfección fue establecida en el 81%³². La lesión histológica fue más severa en el grupo de pacientes con antecedentes de drogadicción endovenosa. La infección simultánea con el HIV, como ha sido descrito por otros³³, puede constituir un factor importante para este mayor compromiso histológico. De los 8 pacientes coinfectados con el HIV dos presentaban lesiones histológicas avanzadas, uno una hepatitis crónica severa y el otro una cirrosis. El daño histológico hallado es de todas formas menor a lo comunicado por otros autores posiblemente debido al escaso número en nuestra serie de pacientes coinfectados con el HIV y a que ninguno de ellos presentaba enfermedad asociada con el SIDA, lo que sugeriría un menor compromiso del sistema inmune. Algunos autores han propuesto que el genotipo 3 podría tener una mayor patogenicidad y por lo tanto producir una enfermedad hepática más severa¹⁰. El nivel de la carga viral, el cual no ha sido evaluado en la presente casuística, representaría otro factor asociado a una más rápida evolución de la hepatopatía. El hallazgo en esta serie de un mayor compromiso histológico en los pacientes drogadictos infectados con el genotipo 3, en comparación con el predominio de lesiones leves en el grupo control infectados con este mismo genotipo, haría suponer la existencia de algún otro factor independiente al nivel de la viremia, que condicionaría esta mayor severidad.

Bibliografía

1. Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 1995; 21: 570-82.
2. McOmish F, Yap P, Dow B, et al. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 884-92.
3. Takada N, Takase S, Takada A, Date T. Differences in the hepatitis C virus genotypes in different countries. *J Hepatol* 1993; 17: 277-83.
4. Pawlotsky J, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, et al. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic C hepatitis C. *J Inf Dis* 1995; 171: 1607-10.
5. Zein N, Persing D. Hepatitis C genotypes. Current trends and future implications. *Mayo Clin Proc* 1996; 71: 458-62.
6. Findor JA, Daruich J, Schijmann A, et al. Prevalence of different genotypes in a cohort of patients with chronic hepatitis C in Argentina. *Hepatology* 1996; 24: 510a.
7. Quarleri J, Robertson B, Mathet V, et al. Genomic and phylogenetic analysis of hepatitis C virus strains from Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*; 1998; 58: 153-9.
8. Lau J, Davis G, Prescott L, et al. Distribution of hepatitis C virus genotypes determined by line probe assay in patients with chronic hepatitis C seen at tertiary referral centers in the United States. *Ann Intern Med* 1996; 124: 868-76.
9. Kleter B, Brouwer J, Nevens F, et al. The Benelux Study Group on Treatment of Chronic Hepatitis C. Hepatitis C virus genotypes: epidemiological and clinical associations. *Liver* 1998; 18: 32-8.
10. McOmish F, Chan SW, Dow B, et al. Detection of three types of hepatitis C virus in blood donors: Investigation of type-specific differences in serologic reactivity and rate of alanine aminotransferase abnormalities. *Transfusion* 1993; 33: 7-13.
11. Zeuzem S, Teuber G, Lee JH, Rüster B and Roth WK. Risk factors for transmission of hepatitis C. *J Hepatol* 1996; 24 (2 Suppl) 3-10.
12. Seme K, Poljak M, Lesnicar G, Brinovec V, Stepec S, Koren S. Distribution of hepatitis C virus genotypes in Slovenia. *Scand J Infect Dis* 1997; 29: 29-31.
13. Stark K, Schreier E, Muller R, Wirth D, Driesel G, Bienzle U. Prevalence and determinants of anti-HCV seropositivity and of HCV genotype among intravenous drug users in Berlin. *Scand J Infect Dis* 1995; 27: 331-7.
14. Gournay J, Marcellin P, Martinot-Peignoux M, et al. Hepatitis C virus genotypes in French blood donors. *J Med Virol* 1995; 45: 399-404.
15. Forns X, Maluenda M, López-Labrador F, et al. Comparative study of three methods for genotyping hepatitis C virus strains in samples from Spanish patients. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2516-21.
16. Apichartpiyakul C, Chittivudikarn C, Miyajima H, Homma M, Hotta H. Analysis of hepatitis C virus isolates among healthy blood donors and drug addicts in Chiang Mai, Thailand. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2276-9.
17. Sánchez Quijano A, Abad M, Torronteras R, et al. Unexpected high prevalence of hepatitis C virus genotype 4 in Southern Spain. *J Hepatol* 1997; 27: 25-9.
18. González J, Flichman D, Munne M, et al. Estudio de la endemia por virus de hepatitis C (HCV) en drogadictos endovenosos (Dev) en Buenos Aires. Resultados preliminares. *Archivos Arg Enf Ap Digest* 1996; 10: 271.
19. Knodell R, Ishak K, Black W, Chen T, Craig R, Kaplowitz. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1: 431-5.
20. Silini E, Bono F, Cividini A, et al. Molecular epidemiology of hepatitis C virus infection among intravenous drug users. *J Hepatol* 1995; 22: 691-5.
21. Ravaggi A, Zonaro A, Marin MG, et al. Distribution of viral genotypes in Italy determined by hepatitis C virus typing by DNA immunoassay. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2280-4.
22. Pol S, Thiers V, Noursbaum J, et al. The changing relative prevalence of hepatitis C virus genotypes: evidence in hemodialyzed patients and kidney recipients. *Gastroenterology* 1995; 108: 581-3.
23. Noursbaum J, Pol S, Nalpas B, Landais P, Berthelot P, Bréchet C and Collaborative Study Group. Hepatitis C virus Type 1b (II) infection in France and Italy. *Ann Intern Med* 1995; 122: 161-8.

24. Mihm S, Fayyazi A, Hartmann H, Ramadori G. Analysis of histopathological manifestations of chronic hepatitis C virus infection with respect to virus genotype. *Hepatology* 1997; 25: 735-9.
25. Oubiña J, Quarleri J, Rudzinski M, Parks C, Badia I, González Cappa S. Genomic characterization of hepatitis C virus isolates from Argentina. *J Med Virol* 1995; 47: 97-104.
26. Stuyver L, Fretz C, Esquivel C, et al. Maertens G and Fournel J. Hepatitis C virus (HCV) genotype analysis in apparently healthy anti-HCV positive Parisian blood donors. *Transfusion* 1996, 36: 552-8.
27. Mondelli M, Cerino A, Bono F, et al. Hepatitis C virus core serotypes in chronic HCV infection. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2523-7.
28. Zein N, Poterucha J, Wiesner R, Gross J, Gossard A, Wendt N. Hepatocellular carcinoma in patients infected with different hepatitis C genotypes *Gastroenterolog* 1995; 108 (suppl): A 1207.
29. Ballardini G, Manzin A, Giostra F, et al. Quantitative liver parameters of HCV infection: relation to HCV genotypes, viremia and response to interferon treatment. *J Hepatol* 1997; 26: 779-86.
30. Martin P, Di Bisceglie A, Kassianides C, et al. Rapidly progressive non-A, non-B hepatitis in patients with HIV infection. *Gastroenterology* 1989; 97: 1559-61.
31. Hagiwara H, Hayashi N, Mita E, et al. Quantitation of hepatitis C virus RNA in serum asymptomatic blood donors and patients with type C chronic liver disease. *Hepatology* 1993; 17: 545-50.
32. García-Samaniego J, Soriano V, Castilla J, et al. Influence hepatitis C virus genotypes and HIV infection on histological severity of chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 1997; ??: 1130-4.
33. Sánchez-Quijano A, Andreu J, Gavilán F. Influence of human immunodeficiency virus type 1 infection on the natural course of chronic parenterally acquired hepatitis C. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 949-53.

The only certainty about biotechnology is that it is still in its infancy. Uncertainties remain hidden by the aura of success surrounding cell biology. Sheer complexity creates novel difficulties. Sheer success is also a distraction from understanding. The engineers taking cells apart, mechanism by mechanism, are understandably so excited by the marvellous delicacy of what they find that they have little inclination for the systems analysis that engineers in other fields insist upon. The big picture is in danger of being hidden by the details.

En cuanto a biotecnología, lo único cierto es que todavía está en su infancia. Incertidumbres permanecen ocultas por la aureola de éxito que envuelve a la biología celular. Extrema complejidad crea nuevas dificultades. Los ingenieros que rompen las células, mecanismo tras mecanismo, están entendiblemente tan encandilados por lo maravillosamente delicado de lo que encuentran que les queda poca inclinación para los análisis de sistema sobre los que insisten otros ingenieros en otras disciplinas. La imagen grande corre peligro de encontrarse tapada por el detalle.

John Maddox

What remains to be discovered. Mapping the secrets of the Universe, the Origins of life, and the Future of the Human Race. New York: Free Press, 1998, p 168