

CARACTERIZACION GENOTIPICA DE LA INFECCION POR EL VIRUS DE HEPATITIS C EN NIÑOS

MARIA INES GISMONDI¹, MARIA VICTORIA PRECIADO^{1*}, ISABEL BADIA², AMALIA FERRO²,
CRISTINA GALOPPO², SAUL GRINSTEIN¹

¹ Laboratorio de Virología, ² Unidad de Hepatología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires

Resumen El diagnóstico de la infección pediátrica y la genotipificación del virus de hepatitis C (HCV) se realizó por RT-PCR anidada de la región 5' no codificante (5'NC) del genoma viral combinada con el análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción. De una población de 64 pacientes pediátricos, 32 mostraron RT-PCR anidadas positivas para ARN viral sérico. En 25/32 casos se pudo realizar un seguimiento de la viremia a lo largo del tiempo. Como resultado del seguimiento se obtuvo: 36% (n=9) de los casos mantuvo su RT-PCR anidada positiva, el 20% (n=5) presentó una disminución de los niveles séricos de ARN viral por debajo del límite de detección de la técnica, el 36% (n=9) de los casos presentó niveles alternantes de viremia y el 8% (n=2) inicialmente fue negativo por RT-PCR anidada y luego mostró resultados positivos a lo largo del seguimiento. La distribución de los genotipos de HCV se estudió en 27/32 niños y en 9 madres, siendo el genotipo 1 el predominante. El genotipo viral se mantuvo constante a lo largo del período estudiado y fue el mismo en todas las parejas madre-hijo analizadas. No pudimos establecer una correlación entre el genotipo viral y la transmisión vertical de HCV. Este estudio será de utilidad para caracterizar el comportamiento del HCV en la infección pediátrica y la respuesta de sus hospedadores durante la infección temprana.

Palabras clave: virus de la hepatitis C, genotipificación de HCV, niños

Abstract *Genotype characterization of hepatitis C virus infection in children.* Hepatitis C virus (HCV) infection in children was assessed by RT-nested PCR of the 5' untranslated region (5' UTR) of the viral genome combined with virus genotyping, performed by restriction fragment length polymorphism (RFLP). We analysed HCV infection in 64 children and in 9 HCV chronically infected mothers corresponding to 10 of them. Thirty two children were positive for serum HCV RNA as determined by RT-nested PCR. The viremia was analysed in consecutive samples of 25 children. Nine children (36%) were always positive for HCV RNA, in 5 (20%) a positive RT-nested PCR turned negative in subsequent samples, other 9 (36%) showed alternating RT-nested PCR results and in 2 (8%) the RT-nested PCR turned positive after an initial negative result. The HCV genotype distribution was studied in 27/32 children and in 9 mothers, and it was similar to that reported in the literature for adult and pediatric patients in our country. Genotype 1 was predominant in our population. HCV genotype did not change in the same patient during the time of this study. HCV genotype was the same in mother-infant pairs. We could not establish a correlation between HCV genotype and vertical transmission of HCV. This study will be helpful to further analyze HCV behavior during pediatric infection and the host's response in the initial stages of it.

Key words: hepatitis C virus, HCV genotyping, children

El virus de la hepatitis C (HCV), perteneciente a la familia *Flaviviridae*, es un virus hepatotrofo, si bien se han descrito localizaciones extrahepáticas del mismo^{1,2,3}. La infección por HCV es poco frecuente en niños y su

historia natural poco conocida⁴. La infección crónica por HCV en niños es típicamente asintomática y detectada solamente cuando se estudia a pacientes con factores de riesgo o se encuentran transaminasas aumentadas en análisis solicitados de rutina⁵. La mayoría de las infecciones por HCV en niños están relacionadas con el antecedente de reiteradas transfusiones de sangre o sus productos, contaminados. Las siguientes condiciones están asociadas a la infección por HCV en niños y adolescentes: talasemia, esferocitosis, hemofilia, antecedente de tumores, hemodiálisis, trasplantes de órganos sólidos, cardiocirugía, drogadicción endovenosa, madre con HCV crónica, conviviente con portador de HCV. La

Recibido: 19-VI-2001

Aceptado: 21-IX-2001

*Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas)

Dirección postal: Dra. María Victoria Preciado, Laboratorio de Virología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Gallo 1330, 1425 Buenos Aires, Argentina.

Fax: (54-11) 4963-7569

e-mail: preciado@conicet.gov.ar

prevalencia de HCV en niños con talasemia es de 60%⁶, con hemofilia llega al 98%⁷ y en niños hemodializados entre 15 y 20%⁸. Desde la determinación de los marcadores serológicos anti-HCV en bancos de sangre la posibilidad de esta vía de infección ha disminuido significativamente. La drogadicción endovenosa materna y la transmisión perinatal contribuyen actualmente a la diseminación de la infección por HCV en la población pediátrica.

El HCV tiene un genoma ARN de polaridad positiva, de aproximadamente 9,5 kb de longitud. Como otros virus con genoma ARN tiene una alta tasa de mutación, pero a pesar de ello presenta regiones conservadas que se localizan en la región 5' no codificante (5' NC) y en el extremo 3'⁹.

La alta variabilidad genómica de los aislamientos de HCV ha permitido su clasificación en 6 genotipos diferentes (designados del 1 al 6) con una homología de secuencias menor al 69%, a su vez cada genotipo incluye uno o más subtipos con una homología cercana al 79% (designados a - g, según su fecha de descubrimiento)¹⁰.

Se ha observado que los genotipos de HCV tienen una distribución geográfica particular. Algunos se encuentran ampliamente distribuidos en todo el mundo (1a, 1b, 2a y 2c) mientras que otros se han hallado en ciertas regiones específicas solamente (5a, 6a y 4)^{11, 12, 13}.

La genotipificación de HCV ha adquirido relevancia clínica y epidemiológica ya que se lo ha relacionado con la vía de transmisión de la infección¹⁴, por ejemplo el genotipo 3 es el predominante en los pacientes drogadictos endovenosos¹⁵, y en la respuesta al tratamiento con interferón¹².

En el marco de un análisis exhaustivo de la infección por HCV, en este trabajo nos propusimos caracterizar la distribución de genotipos de HCV en una población de pacientes que concurren a la Unidad de Hepatología del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, de la Ciudad de Buenos Aires. Esto constituye el paso inicial en el análisis del comportamiento del HCV en la población pediátrica estudiada, y nos permitirá conocer más acerca de la evolución de la infección por HCV en su etapa temprana.

Pacientes y métodos

Pacientes: Entre junio de 1998 y diciembre de 2000, estudiamos 64 pacientes (28 mujeres y 36 varones; mediana de edad 3 años, rango 40 días a 19 años) que concurren a la Unidad de Hepatología del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. Cincuenta y siete pacientes fueron positivos y 7 negativos (2 sometidos a trasplante hepático, 2 con inmunodeficiencia primaria y 3 HIV positivos) para el test de tamizaje de anticuerpos anti-HCV utilizando la técnica de ELISA de tercera generación (*Ortho Diagnostics Systems*, Raritan, New Jersey). Se estudiaron también 9/21 madres HCV+ correspondientes a 10 de los

pacientes pediátricos incluidos en este estudio, de las cuales se contaba con muestra de suero.

Los factores de riesgo asociados a la infección por HCV en la población pediátrica estudiada fueron: antecedentes de transfusión de sangre y/o hemoderivados previa/s a 1991 (22/64), antecedentes de infección materna por HCV (22/64) o trasplante hepático previo a la detección de HCV (2/64). Cuatro pacientes presentaban hepatopatía crónica sin etiología conocida, por lo que se realizó la determinación de RT-PCR anidada para descartar una infección por HCV. Por último, no se detectaron factores de riesgo conocidos de transmisión de HCV en 14 pacientes.

Recolección de muestra: se tomaron 3-5 ml de sangre periférica sin anticoagulante. El suero se separó dentro de las 5 horas de extraída la muestra y se conservó a -70°C hasta su procesamiento.

Extracción del ARN viral: El ARN presente en 200 µL de suero se extrajo utilizando el reactivo de *TRIZOL* (*GIBCO BRL*®), según indicaciones del fabricante. Como control de extracción se utilizó ARN del fago MS2 (*Boehringer Mannheim*), que fue procesado al mismo tiempo dentro de cada tubo. La presencia de ARN del fago en el producto de extracción se visualizó mediante electroforesis de 10 µL de ARN extraído en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (1.4 mg/mL).

Amplificación de la región 5' no codificante (5' NC) del HCV: Se realizó mediante la técnica de retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) anidada, en un termociclador *Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400*. La mezcla de reacción de RT-PCR, cada 50 µL, contuvo 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH=8.4), 1.5 mM MgCl₂, 0.16 mM de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), 0.4 µM de cada iniciador, 1 U de *Taq* ADN polimerasa (*Promega*®) y 20 U de retrotranscriptasa M-MLV (*Promega*®). Las secuencias de los iniciadores usados para la primera vuelta de la PCR fueron las siguientes: Iniciador sentido 5' GTG AGG AAC TAC TGT CTT CAC GCA G 3' e iniciador antisentido 5' TGC TCA TGG TGC ACG GTC TAC GAG A 3' (*GIBCO BRL*®). La segunda vuelta de amplificación se realizó a partir de 5 µL de producto de la primera vuelta de PCR, siendo la mezcla de reacción igual a la de la primera vuelta, con excepción de la MMLV-RT, que no fue incluida. Los iniciadores utilizados en esta segunda etapa fueron: Iniciador sentido 5' TTC ACG CAG AAA GCG TCT AG 3' e iniciador antisentido 5' CAC TCT CGA GCA CCC TAT CAG GCA GT 3' (*GIBCO BRL*®). La amplificación se realizó de acuerdo al siguiente protocolo: un ciclo de retrotranscripción a 42° C 15 min, luego la primera vuelta a 95° C 3 min, 30 ciclos de 95° C 1 min, 62° C 1 min y un ciclo 72° C 7 min. La segunda vuelta se realizó bajo las mismas condiciones de amplificación, excepto la etapa de retrotranscripción. Veinte µL del producto de la segunda vuelta fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2% con 1.4 mg/mL de bromuro de etidio, controlándose la obtención de una banda de 251 pb. La sensibilidad de la RT-PCR anidada utilizada alcanza las 10 copias/mL de suero.

Análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP): Se realizó la digestión enzimática de 10 µL de producto de la 2ª vuelta de PCR en un volumen final de 20 µL. Las restricciones con a) *RsaI/HaeIII*, b) *HinfI/MvaI* y c) *SrfI* se efectuaron a 37° C durante 4 hs, mientras que cuando se utilizó *BstUI* las condiciones de digestión fueron una hora a 60° C. Los productos de restricción se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% en buffer TBE 1 X. El gel se teñió con bromuro de etidio (1 mg/mL) y se visualizó con un transiluminador con luz UV. Los patrones de restricción fueron analizados según lo descrito por Davidson y col.¹⁶. La técnica de genotipificación utilizada permite clasificar a las muestras estudiadas en genotipos 1 a 6 a partir de la primera

restricción enzimática. Para caracterizar el subtipo viral se realiza la segunda digestión, que permite discriminar los subtipos a/c y b para el genotipo 1, los subtipos a/c y b/c para el 2 y los subtipos a/c/d/e y b/f para el genotipo 3¹⁷.

Resultados

De los 64 pacientes, 32 resultaron positivos para HCV determinado por RT-PCR anidada de la región 5'NC (Tabla 1). Dado que los pacientes tanto positivos como negativos con factores de riesgo se siguen en el tiempo por control clínico, a 25 de los 32 pacientes positivos para HCV por RT-PCR anidada se les realizó un seguimiento en el tiempo, ya que pudo obtenerse más de una muestra. En 9/25 casos, el ARN viral sérico se mantuvo positivo durante todo el período de seguimiento, en 5/25 pacientes se observó una disminución de los niveles séricos de ARN viral por debajo del límite de detección de la RT-PCR anidada, en 9/25 pacientes los resultados de RT-PCR anidada fueron alternantes, tanto positivos como negativos y finalmente en 2/25 pacientes el ARN viral fue indetectable inicialmente y a lo largo del segui-

miento la viremia aumentó a niveles detectables por RT-PCR anidada.

Dentro de las transmisiones verticales, a partir del conocimiento del status HIV materno, se observó que 4/11 (36.4%) madres HIV y HCV positivas constituyeron el único factor de riesgo de infección por HCV para sus 5 hijos; por otro lado, 6/10 (60%) madres HIV negativas y HCV positivas también constituyeron el único factor de riesgo de infección por HCV para sus 6 hijos (Tabla 3).

Del total de 21 madres se pudo obtener muestras de suero en 9 casos. La infección por HCV en 2/9 madres constituyó el único factor de riesgo conocido para 3 niños HCV positivos determinado por RT-PCR anidada (una madre tenía dos hijos). Sólo 1/2 madres era HIV positiva. No pudo determinarse si hubo cotransmisión de HIV y HCV, ya que por su edad los niños se encuentran aún en el período de seguimiento de su infección por HIV al momento de realizarse este trabajo.

Se realizó el análisis de los genotipos de HCV presentes en 27/32 pacientes positivos de los cuales se disponía de suficiente muestra (Figuras 1 y 2) (Tabla 2). El genotipo predominante fue 1 (92%) y no se encontró

TABLA 1.- Datos generales de la población estudiada

| | Total | Vía de transmisión de HCV | | |
|---------------------------|----------------|---------------------------|---------------|---------------|
| | | Transfusional | Vertical | Desconocida |
| Pacientes estudiados | 64 | 22 | 22 | 20 |
| Rango de edades (mediana) | 40d - 19a (3a) | 3m - 17a (11a) | 40d - 5a (6m) | 1m - 15a (3a) |
| Relación varones:mujeres | 36:28 | 2:1 | 2:3 | 3:2 |
| HIV + | 16 | 3 | 8 | 5 |
| RT-PCR+ para HCV 5'NC | 32 | 16 | 11 | 5 |

d: días; m: meses; a: años; HCV: Virus de hepatitis C.

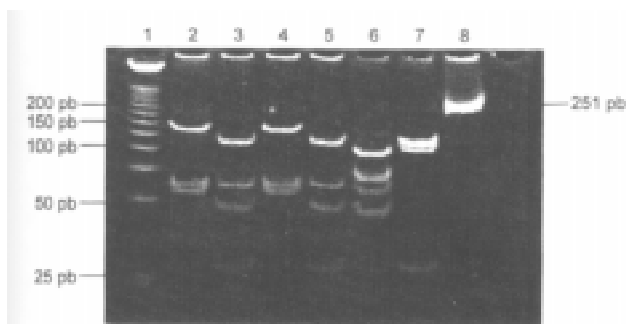


Fig. 1.- Mapa de restricción de productos de RT-PCR de la región 5'NC de HCV. Los productos de RT-PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% y posterior tinción con bromuro de etidio. 1: Marcador de PM 25 bp; 2,4,6: Producto de RT-PCR digerido con *HinfI/MvaI*; 3,5,7: Producto de RT-PCR digerido con *HaeIII/RsaI*; 8: Producto de RT-PCR sin digerir. (Genotipo 1: calles 6-7; genotipo 2: calles 2-5).

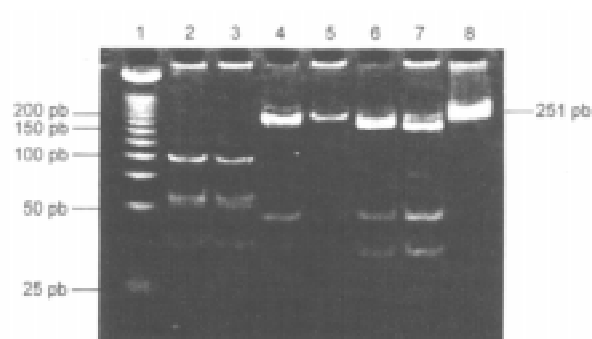


Fig. 2.- Mapa de restricción de productos de RT-PCR de la región 5'NC de HCV. 1: Marcador de PM 25 bp; 2-3: Producto de RT-PCR digerido con *ScaFI*; 4-7: Producto de RT-PCR digerido con *BstUI*; 8: Producto de RT-PCR sin digerir. (Genotipo 2a/c: calles 2-3; genotipo 1a/c: calles 4-5; genotipo 1b: calles 6-7)

TABLA 2.- Genotipificación del HCV presente en muestras de niños y madres

| | Total n | Genotipo | | | | | |
|--------------------------------|------------|-----------|---------|-----------|-----------|---------------|-----------|
| | | 1a/c n | 1b n | 2a/c n | 2b/c n | 3a/c/d/e n | 3b/f n |
| <i>Madres</i> | | | | | | | |
| Transmisión vertical de HCV | 2 | 1 | 1 | - | - | - | - |
| Ausencia de transmisión de HCV | 7 | 3 | 3 | - | - | 1 | - |
| <i>Niños</i> | | | | | | | |
| Madre HCV positiva | 10 | 6 | 3 | 1 | - | - | - |
| Transmisión transfusional | 12 | 4 | 7 | - | - | 1 | - |
| Vía de transmisión desconocida | 5 | 5 | - | - | - | - | - |

TABLA 3.- Transmisión vertical de HCV: Efecto de la coinfección materna por HIV

| | | Madre HIV + n | Madre HIV - n |
|--------------|-------|------------------|------------------|
| <i>Niños</i> | HCV + | 5 | 6 |
| | HCV - | 7 | 4 |

* Sin significación estadística. $P > 0.05$, Test exacto de Fisher

muestra alguna perteneciente al genotipo 4,5 o 6. En los casos en los que se contaba con más de una muestra, el genotipo viral infectante se mantuvo constante durante todo el período de seguimiento. Se evaluó el genotipo viral presente en las 9 muestras de sangre materna. Los genotipos hallados en las parejas madre-hijo fueron coincidentes en los 3 casos en que el único factor de riesgo conocido de transmisión de HCV fue la infección materna.

Discusión

En los 25 pacientes en los cuales se pudo realizar un seguimiento se observaron diferentes comportamientos en cuanto a la presencia de viremia. Un 36% de los casos mantuvo una infección activa a lo largo del tiempo, en tanto en el 20% de ellos las viremias fueron negativas luego de una primera RT-PCR anidada para HCV positiva. Esto podría indicar que en estos últimos el virus se localiza en otro reservorio no sérico, tal como los monocitos, lo cual ha sido previamente descrito por otros autores^{3,18}. Por otra parte en el 36% de los casos se observaron resultados alternantes positivos y negativos de RT-PCR anidada para HCV lo cual coincide con lo descrito en otros estudios con pacientes pediátricos^{19,20}.

Dadas las diferencias que se observan en cuanto al comportamiento de los hospedadores frente al virus, es nuestro objetivo futuro evaluar la respuesta inmune celular en estos pacientes frente a péptidos sintéticos derivados de HCV, para poder establecer correlaciones entre marcadores biológicos y progresión de la enfermedad.

En lo referente a la distribución de los genotipos de HCV hallados en la población pediátrica en estudio se observó un predominio de genotipo 1 (92 %) siendo a su vez un 60% genotipo 1a/c y un 40% genotipo 1b. No se observó una relación entre genotipo 1a/c o 1b y la vía de transmisión. La prevalencia de genotipo 1 es coincidente con lo descrito por otros autores en nuestro país en estudios con pacientes adultos^{15, 21}, en grupos mixtos adultos y pediátricos^{22, 23} y pacientes pediátricos hemofílicos¹⁷. Sin embargo, no se detectó coinfección por múltiples genotipos en nuestra población pediátrica a diferencia de lo hallado por otros investigadores en pacientes pediátricos¹⁷ y en grupos mixtos de pacientes adultos y pediátricos en nuestro país^{15, 23}.

A pesar de que otros autores en nuestro país han descrito la presencia de genotipo 4^{15, 21, 24} y genotipo 5²³, en este trabajo no se encontró muestra alguna perteneciente a los genotipos 4, 5 ni 6 lo cual coincide con lo observado por Quarleri y col²².

La persistencia del mismo genotipo viral a lo largo del período de seguimiento en las muestras estudiadas permite suponer que el virus ha podido adaptarse satisfactoriamente a su nuevo hospedador. Otros autores han descrito la variación del genotipo viral infectante en muestras seguidas a lo largo del tiempo^{17, 25}. En consecuencia, el futuro seguimiento de los pacientes incluidos en este estudio permitirá establecer si el genotipo de HCV sigue siendo constante como hasta ahora o presenta variación.

La vía de transmisión no estuvo relacionada con el genotipo viral infectante, ya que se han observado los

mismos genotipos en muestras de pacientes con distintas vías de transmisión. En este sentido, hemos observado que los niños infectados por vía vertical presentaron distintos genotipos de HCV (1a/c, 1b, 2a/c), de acuerdo a lo presentado en la Tabla 2. Además, en los tres casos de transmisión vertical en que se contaba con una muestra de suero materna, los genotipos virales hallados en dichas muestras maternas y en las de sus hijos fueron 1a/c o 1b. La evaluación de un mayor número de casos de transmisión vertical permitirá elucidar la tendencia observada de que la transmisión por vía vertical del HCV no está asociada a genotipo viral alguno.

Los genotipos virales encontrados en las madres estudiadas permitieron disponer de una herramienta adicional para sustentar la vía de transmisión vertical. Para confirmar la misma, hemos iniciado la secuenciación de otras regiones del genoma de HCV, a fin de realizar estudios filogenéticos que permitan establecer relaciones entre los genomas virales hallados en las muestras de las parejas madre-hijo analizadas. Nuestros resultados indican que el genotipo viral hallado en las madres se transmitió al niño en las 3 parejas madre-hijo estudiadas.

En lo que respecta al incremento de la transmisión vertical de HCV en los casos de coinfección materna por HIV, el Test exacto de Fischer no reveló significación estadística. Existen datos contradictorios sobre este tema. Zucotti y col publicaron datos concordantes con los obtenidos en el presente trabajo, en los que la tasa de transmisión vertical de HCV no se vio incrementada en los casos de coinfección materna por HIV²⁶. Sin embargo, otros autores han demostrado que la transmisión vertical de HCV se ve incrementada en estos casos^{19, 27}. El análisis de un mayor número de casos permitirá determinar cuál es el efecto de la coinfección HIV-HCV sobre la transmisión vertical en nuestra población. Por otra parte, existen otros factores que pueden favorecer la transmisión vertical de HCV, por ejemplo varios autores la han relacionado directamente con la carga viral materna para HCV^{19, 20, 27, 28}. Además, la presencia de HCV en células mononucleares de sangre periférica ha sido bien documentada^{2, 3, 29}; y éstas podrían actuar como un reservorio para el virus, cumpliendo un rol fundamental en la reactivación de la infección¹⁸. Azzari y col han relacionado recientemente el hallazgo de ARN viral (tanto de polaridad positiva como negativa) en células mononucleares maternas en la sangre fetal con la transmisión vertical de HCV¹⁸. La correlación entre estos factores y la transmisión vertical de HCV será explorada por nosotros en futuros estudios.

El presente trabajo constituye el paso inicial en la evaluación del comportamiento del virus durante la infección pediátrica y la respuesta de sus hospedadores en las etapas tempranas de la infección por HCV.

Agradecimientos: MIG es becaria del Ministerio de Salud de la Nación, Subsecretaría de Investigación y Tecnología, Beca Ramón Carrillo-Arturo Oñativia. Los autores agradecen a la Dra. Noemí del Pino por su asesoramiento técnico.

Bibliografía

- Houghton M. Hepatitis C. In: Fields B, Knipe D, Howley P. Virology. 3rd. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p 1035-58
- Lerat H, Rumin S, Habersetzer F et al. *In vivo* tropism of hepatitis C virus genomic sequences in haematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. *Blood* 1998; 91: 3841-9.
- Bouffard P, Hayashi P, Acevedo R, Levy N. Hepatitis C virus is detected in a monocyte/macrophage subpopulation of peripheral blood mononuclear cells of infected patients. *J Infect Dis* 1992; 166: 1276-80.
- Chang M, Ni Y, Hwang L et al. Long term clinical and virologic outcome of primary hepatitis C virus infection in children: a prospective study. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 1994: 769-73.
- Jonas MM. Natural history of HCV infection in childhood. International meeting on paediatric hepatology, Sorrento, Italy Actas 51. 1997.
- Lai ME, De Virgili S, Argioli F, et al. Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a long term prospective study of posttransfusion hepatitis among thalassaemic children: comparison between first and second-generation assay. *J Ped Gastroenterol Nutr* 1993; 16: 458-64.
- Troisi CL, Hollinger B, Hoots WK, et al. A multicenter study of viral hepatitis in a United States hemophilic population. *Blood* 1993; 81: 412-8.
- Fishman LN, Jonas MM, Lavine JE. Update on viral hepatitis in children. *PCNA* 1996; 43: 65-9.
- Tanaka T, Kato N, Cho M-J, Sugiyama K, Shimotohno K. Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol* 1996; 70: 3307-12.
- Simmonds P, Alberti A, Alter H et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994; 19: 1321-4.
- McOmish F, Yap P, Dow B. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 884-92.
- Zein N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 223-35.
- Takada N, Takase S, Takada A, Date T. Differences in the hepatitis C virus genotypes in different countries. *J Hepatol* 1993; 17: 277-83.
- Pawlotsky J, Tsakiris L, Roudot-Thoraval et al. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 1995; 171: 1607-10.
- Findor J, Sorda J, Daruich J et al. Distribución de los genotipos del virus de la hepatitis C en una población Argentina de drogadictos endovenosos. *Medicina (Buenos Aires)* 1999; 59: 49-54.
- Davidson F, Simmonds P, Ferguson J et al. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. *J Gen Virol* 1995; 76: 1197-204.
- Quarleri J, Badía I, Mathet V, Oubifia J. Epidemiología molecular del virus de la hepatitis C (HCV) en pacientes hemofílicos de edad pediátrica. *Pren Med Argent* 1999; 86:181-5.
- Azzari C, Resti M, Moriando M et al. Vertical transmission

- of HCV is related to maternal peripheral blood mononuclear cell infection. *Blood* 2000; 96: 2045-8.
19. American Academy of Pediatrics. Hepatitis C virus infection. *Pediatrics* 1998; 101: 481-5.
 20. Casanovas Lax J, Garcia Silva G, Vargas Romero J et al. Transmisión vertical del virus de la hepatitis C. *An Esp Pediatr* 1997; 47: 627-32.
 21. Picchio GR, Nakatsuno M, Boggiano C et al. Hepatitis C (HCV) genotype and viral titer distribution among Argentinean hemophilic patients in the presence or absence of human immunodeficiency virus (HIV) coinfection. *J Med Virol* 1997; 52: 219-25.
 22. Quarleri J, Robertson Betty, Mathet V et al. Genomic and Phylogenetic analysis of hepatitis C virus strains from Argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 1998; 58: 153-9.
 23. Oubiña J, Quarleri J, Rudzinski M et al. Genomic characterization of hepatitis C virus isolates from Argentina. *J Med Virol* 1995; 47: 97-104.
 24. Alfonso V, Flichman D, Sookoian S, Mbayed V, Campos R. Phylogenetic characterization of genotype 4 hepatitis C virus isolates from Argentina. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1989-92.
 25. Eyster M; Sherman K; Goedert J; Katsoulidou A; Hatzakis A. Prevalence and changes in hepatitis C virus genotypes among multitransfused persons with hemophilia. *J Infect Dis* 1999; 179: 1062-9.
 26. Zuccotti G; Ribero M; Giovannini M et al. Effect of hepatitis C genotype on mother-to-infant transmission of virus. *J Pediatr* 1995; 127: 278-80.
 27. Paccagnini S; Principi N; Massironi E et al. Perinatal transmission and manifestation of hepatitis C virus infection in a high risk population. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14: 195-9.
 28. Azzari C; Resti M; Bortolotti F et al. Serum levels of hepatitis C virus RNA in infants and children with chronic hepatitis C. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 29: 314-7.
 29. Navas S; Martín J; Quiroga JA; Castillo I; Carreño V. Genetic diversity and tissue compartmentalization of the hepatitis C virus genome in blood mononuclear cells, liver, and serum from chronic hepatitis C patients. *J Virol* 1998; 72: 1640-6.

... Estas reflexiones de un investigador que está terminando su trayectoria no tienen otro propósito que despertar la responsabilidad y el entusiasmo de la gente joven que enseña e investiga. Si me contemplo yo mismo cuando tenía 30 años, me doy cuenta que me equivoqué respecto a lo que pensaba que sería el país casi 40 años después. Pequé de optimista pero, sin embargo, no de iluso pues las condiciones están dispuestas para un desarrollo mucho más rápido y efectivo que el que existía en la década del 30. No en vano se han creado organismos que adquirieron experiencia en estos "años arduos", como dice Borges, y también en los anteriores, que nunca fueron plácidos. Las Universidades, la Secretaría de Ciencia y Tecnología, los Consejos de Investigación, las Fundaciones de Ayuda a la Investigación, etc. existen y necesitan el apoyo de todos, el entusiasmo y el talento de los jóvenes y la comprensión de los gobernantes, que saben la importancia de la educación y la investigación para alcanzar la situación que nos corresponde en el concierto de las naciones. No estaremos en la primera fila pero sí en la digna compañía de los países que contribuyen, sin ser superpotencias, al desarrollo de la humanidad.

Alfredo Lanari (1910-1985)

Visión retrospectiva mirando hacia adelante.
Medicina (Buenos Aires) 1978; 38: 206