

Serotipificación de virus de Hepatitis C en pacientes en hemodiálisis

J. Russi*, L. Gadola**, C. Verdaguer**, M. Labella**, H. Chiparelli*, G. Alonso*, M. Pérez*, R. Cruells***, G. Mescia***, A. Varela**** y H. Caorsi*****

* División Laboratorio. Ministerio de Salud Pública. Uruguay. ** Grupo de estudio de Hepatitis C de la Sociedad Uruguaya de Nefrología. Centro de Diálisis Casmu. Centro de Diálisis Renis. *** Grupo de estudio de Hepatitis C de la Sociedad de Gastroenterología del Uruguay. ****Centro de Diálisis del Casmu. Uruguay. *****Centro de Diálisis Renis. Uruguay.

RESUMEN

El virus de la hepatitis C (VHC) tiene una elevada prevalencia en los pacientes en hemodiálisis y presenta altos niveles de variabilidad, habiéndose descrito seis genotipos y varios subtipos. El objetivo del presente estudio es analizar la distribución de los serotipos de VHC en donantes de sangre y en los pacientes de dos Centros de Hemodiálisis con anticuerpos para VHC, mediante la determinación de anticuerpos específicos de genotipos localizados en el antígeno NS4 (Murex HCV Serotyping 1-6) y las posibles vías de transmisión en los hemodializados. **Resultados:** Se observó serotipo único en 21 pacientes, no tipificable en ocho pacientes y más de un serotipo en cinco pacientes. El serotipo 2 se observó con frecuencia significativamente mayor en el Centro A (6/11) vs Centro B (1/23) (χ^2 $p < 0,05$). No se observaron diferencias significativas en la edad, tiempo en hemodiálisis o detección de ARN viral según los serotipos. **Conclusiones:** La frecuencia significativamente mayor de un serotipo de virus de hepatitis C infrecuente (el 2) en los pacientes de un Centro de hemodiálisis apoya la hipótesis de la transmisión nosocomial de esta infección y destaca la importancia de la serotipificación en los estudios epidemiológicos.

Palabras clave: **Virus C. Serotipos. Hemodiálisis.**

SEROTYPES OF HEPATITIS C VIRUS IN HEMODIALYSIS PATIENTS

SUMMARY

*Hepatitis C virus infection is highly prevalent in hemodialysis patients. This RNA virus has a high variability. All known variants have been classified into six major genotypes and several subtypes. The aim of this study was to try to identify the possible source of infection by the distribution pattern of HCV serotypes (antibodies against specific epitopes, Murex HCV Serotyping 1-6 assay). Among hemodialyzed patients of two Hemodialysis Units. (Unit A: 11 patients and Unit B: 23 patients) and 11 blood donors. **Results:** Hepatitis C virus serotype 1 was dominant (14 hemodialyzed patients and 2 blood donors). (Tables I y II). Serotype 2 was significantly more frequent (χ^2 $p < 0,05$) in Dialysis Unit A (6/11) vs B (1/23). No association was found between HCV serotypes and demographic fea-*

Recibido: 10-IX-97
En versión definitiva: 17-II-98
Aceptado: 20-II-98

Correspondencia: Dra. Liliana Gadola
18 de julio. 2103 Apto. 802
11200 - Montevideo. Uruguay

tures of patient (Table III). Conclusion: The significantly higher prevalence of serotype 2 in one Dialysis Unit may imply that nosocomial infection was the main cause of HCV transmission in those patients and it emphasizes the utility of HCV serotyping in epidemiological studies.

Key words: **Virus C. Serotypes. Hemodialysis.**

INTRODUCCION

La infección por virus de hepatitis C (VHC) tiene una elevada prevalencia entre los pacientes en hemodiálisis crónica (HDC)^{1,2}. Se han planteado como causas probables las transfusiones sanguíneas y la transmisión nosocomial^{3,4}.

El VHC es un virus ARN de cadena positiva que presenta altos niveles de variabilidad habiéndose descrito hasta el momento seis genotipos mayores y más de 20 subtipos. Se ha propuesto que diferentes genotipos se asocian con diferente severidad de la hepatopatía y diferente respuesta al tratamiento.

Recientemente se ha desarrollado un test por técnica de ELISA para detección de anticuerpos dirigidos contra epitopos específicos de genotipo α -variantes antigénicas de la proteína NSH del VHC⁵.

El objetivo del presente estudio es analizar la distribución de los serotipos de VHC en donantes de sangre y en los pacientes en dos Centros de Hemodiálisis con anticuerpos para VHC (AcVHC), mediante la determinación de anticuerpos específicos de genotipos y las posibles vías de transmisión en los hemodializados.

METODOLOGIA

En agosto de 1996 se analizaron los serotipos de 11 donantes de sangre con AcVHC y de pacientes en HDC de dos centros (A y B) de Montevideo (Uruguay), que presentaban AcVHC positivos. En el centro B ocurrió una epidemia de hepatitis noA noB en 1988-1989 que se confirmó como hepatitis C cuando en 1991 se determinaron AcVHC por técnica de ELISA II. En el Centro A la tasa de seroconversión para AcVHC aumentó en 1992-93. Eran 34 pacientes: 24 hombres y 10 mujeres, con edad media 61 años (rango 24 a 90) y un tiempo en hemodiálisis promedio de 92 ± 43 meses (rango 18 a 172). Había 11 pacientes del Centro A (donde la prevalencia de pacientes con AcVHC era 16%) y 23 pacientes en el Centro B con una prevalencia 22%. Ningún paciente tenía anticuerpos detectables para VIH ni antígeno de superficie del virus B. Se registró si el paciente fue transfundido en el período previo a la fecha de inicio de la Hepatitis. Se consideró la evolución desde el momento en que se detectó seroconversión de los

AcVHC y/o aumento de los niveles de transaminasas con posterior confirmación de AcVHC positivos. En ambos Centros se reusan los dializadores (fibras capilares) mediante lavado en pileta, separada para pacientes positivos y negativos para AcVHC a partir de 9/93 en el centro A y de 3/93 en el centro B.

La serología para determinación de AcVHC se realizó utilizando un procedimiento de ensayo inmunoenzimático de segunda generación (HCV EIA Abbott). Los sueros reactivos fueron confirmados por inmunoensayo en línea (LIATEK HCV, Organon Teknika) de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

La investigación de ARN viral (RT-PCR) se realizó mediante extracción del ARN de 100 μ l de plasma por el método del isotiocianato de guanidinio-cloroformofenol y se sintetizó ADNc utilizando la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney, a partir del extremo 5' NCR del genoma viral. Luego de una doble ampliación (nested PCR) los ampliados fueron revelados por migración electroforética en gel de agarosa con tinción con bromuro de etidio.

La serotipificación viral se realizó mediante un test que determina en los sueros de los pacientes la presencia de anticuerpos dirigidos contra epitopos específicos de genotipo localizados en el antígeno NS4 (Murex HCV Serotyping 1-6 assay).

Se determinaron mensualmente enzimas hepáticas. Transaminasa glutámico pirúvica y oxalacética (TGP y TGO) mediante técnica cinética con lectura por luz ultravioleta automatizada (Valor normal TGO < 29 mU/ml y TGP < 33 mU/ml). Se determinaron cada seis meses: a) Colinesterasa mediante técnica colorimétrica cinética de punto final (automatizada) (Valor normal 5.3 - 12.9 U/ml), b) Albuminemia mediante electroforesis en acetato de celulosa (Valor normal 4g%) y c) tiempo de protrombina por método electromagnético con reactivo de Tromboplastina C1 plus con lectura en STA compact automático (Valor normal 70 - 100%). Se evaluó la presencia de signos indirectos de hipertensión portal por medio del examen físico, ecografía abdominal y/o tomografía axial computarizada de abdomen. Se planteó realizar biopsia hepática a aquellos pacientes candidatos a trasplante renal y sin contraindicaciones para eventual tratamiento. Sólo uno de los pacientes aceptó y se le realizó biopsia hepática por fibrolaparoscopia con estudio

histológico. El período de observación de la evolución clínica desde la seroconversión de los AcVHC y/o aumento de los niveles de transaminasas con posterior confirmación de AcVHC positivos a la fecha del corte fue entre 18 meses y ocho años. En 24/34 pacientes el seguimiento evolutivo fue de cinco o más años.

RESULTADOS

En la **Tabla I** se muestran los resultados de TGO, TGP, PCR y serotipos obtenidos en agosto/96. En la **Tabla II** se observan los serotipos encontrados en los donantes de sangre. En los hemodializados se encontró serotipo único en 21 pacientes (pac.), (serotipo 1 en 14 pac., serotipo 2 en 6 pac. y serotipo 3 en 1 pac.), serotipo no tipificable en 8 pac. y en 5 pac. más de un serotipo simultáneamente. El serotipo 1 se observó con mayor frecuencia: en 14 pacientes en hemodiálisis y en 2 donantes. El serotipo 2 estaba presente en 6 pac. en HDC (todos del mismo Centro) y coexistiendo con serotipos 1 y 3 en un paciente del Centro B. El serotipo 3 se encontró en 1 paciente en HDC y en 3 donantes de sangre.

El serotipo 2 se observó con una frecuencia significativamente mayor ($\chi^2 p < 0,05$) en el Centro A (6/11) que en el Centro B (1/23) y donantes de sangre (0/11). La fecha de inicio de la hepatitis fue superior a 1990 en 6/7 pacientes con serotipo 2 y sólo en 11/18 pac. con serotipo 1 (χ^2 NS). El número de pacientes transfundidos fue 10/11 en el centro A y 20/23 en el centro B, sin diferencias entre ambos Centros. El tiempo en hemodiálisis de los pacientes con serotipo 1 fue: 89 ± 40 meses (rango 18 a 160), con serotipo 2: 99 ± 42 meses (rango 58 a 172), con serotipo 3: 40 meses, con más de un serotipo: 84 ± 50 meses (rango 19 a 146) y con serotipo no tipificable: 104 ± 48 meses (rango 51 a 171), sin diferencias significativas entre los diferentes grupos (test de Mann Whitney NS).

No se observaron diferencias significativas en la edad de los pacientes con PCR positivos (63 años, rango 39 a 90) vs negativo (60 años, rango 24 a 79) (test de Mann Whitney NS), con serotipo 1 (59 años, rango 24 a 79) vs serotipo 2 (63 años, rango 53 a 74) (test de Mann Whitney NS), ni tampoco entre aquellos pacientes que presentaban un solo serotipo (59 años, rango 24 a 79) vs varios serotipos simultáneos (65 años, rango 31 y 79) (test de Mann Whitney NS).

Tabla I. Resultados.

Nº PAC	TGO	TGP	PCR	SEROTIPOS	Nº PAC	TGO	TGP	PCR	SEROTIPOS
1	6	2	NEG	1	18	18	26	NEG	1
2	11	20	NEG	2	19	18	14	POS	1,3
3	25	37	NEG	2	20	13	18	NEG	1,3
4	6	6	NEG	NT*	21	16	34	NEG	1,4
5	19	17	NEG	NT	22	11	12	POS	1
6	11	14	NEG	2	23	23	35	POS	1
7	7	5	NEG	2	24	26	23	NEG	1,3
8	19	18	POS	2	25	8	12	NEG	3
9	68	79	NEG	1	26	11	17	NEG	1
10	15	13	NEG	NT	27	18	18	POS	1
11	68	204	NEG	2	28	14	16	POS	NT
12	19	13	POS	1	29	13	9	POS	NT
13	16	30	NEG	1, 2, 3	30	21	16	POS	NT
14	18	12	POS	1	31	9	8	POS	1
15	12	13	POS	1	32	12	15	POS	NT
16	17	5	NEG	1	33	22	26	NEG	NT
17	8	13	NEG	1	34	25	26	POS	1

* No Tipificable.

Tabla II. Serotipos en donantes de sangre

SEROTIPOS	Nº DE DONANTES
1	2
3	3
1 + 3	2
No tipificable	4

Se encontró ARN viral (PCR) positivo en 14/34 pacientes. El tiempo en hemodiálisis de los pacientes con PCR positivo fue de 82.62 ± 36.07 meses (rango 18 a 148) sin diferencias significativas con aquellos con PCR negativo 98.62 ± 46.18 meses (rango 19 a 172) (test de Mann Whitney NS). No se observó diferencia significativa en la presencia de ARN viral según los diferentes serotipos (χ^2 NS) (**Tabla II**). En agosto/96 los pacientes con PCR negativo presenta-

ban niveles de TGO de 20 ± 19 mU/ml y TGP de 30 ± 44 mU/ml, sin diferencia significativa con los pacientes PCR positivo cuyos niveles de TGO fueron 16 ± 4 mU/ml y TGP 15 ± 7 mU/ml (test de "t' NS).

La evolución de la hepatopatía no se analiza por no disponer en todos los pacientes de los estudios necesarios. El único paciente que aceptó ser biopsiado presentaba serotipo 1, TGO y TGP elevadas persistentemente al 5º año, sin elementos clínicos de insuficiencia hepatocítica y la histología mostró una esteatosis hepática.

DISCUSION

La prevalencia de AcVHC en los donantes de sangre en nuestro país es 0,3%⁶, similar a otras áreas geográficas^{7,8}.

La prevalencia de genotipos de VHC en donantes de sangre es variable según las regiones, por ejemplo en Argentina y Brasil predomina el genotipo 1^{9,10,11}. En la muestra de donantes de sangre de nuestro medio se encuentra serotipos 1 y 3.

La hepatitis a virus C tiene una elevada prevalencia en los pacientes en hemodiálisis crónica en nuestro país —aunque ha descendido en los últimos años, 20% en set/95¹², vinculada al descenso de la tasa de seroconversión luego de adoptarse medidas de aislamiento e insistir en el estricto cumplimiento de las medidas de barrera, similar a lo ocurrido en otros países: informe de EDTA 1993: 15,1%¹³.

En los pacientes en HD los genotipos de VHC predominantes varían según los distintos países: en Francia predomina el genotipo 1b^{14,15}, en Italia el 2a y 1b¹⁶ en Argentina^{17,18} y Uruguay^{19,20} el genotipo 1, en tanto que en Arabia Saudita predomina el 4²¹.

La metodología corriente para la genotipificación de VHC a través del análisis del ARN viral es compleja y poco apropiada para su uso en la práctica médica. La introducción de métodos serológicos para establecer los genotipos circulantes es de gran importancia para resolver aquellas dificultades. La síntesis de péptidos específicos de genotipo ha permitido demostrar respuestas inmunes no cruzadas^{5,22,23} posibilitando el diagnóstico del genotipo involucrado en la infección aún en ausencia de ARN circulante, o cuando éste último se ha deteriorado por el almacenamiento de las muestras. El método permite también el diagnóstico retrospectivo de genotipo en infecciones por VHC curadas o controladas. Sin embargo una respuesta inmune disminuida por la presencia de enfermedades asociadas con inmunodeficiencias pueden limitar el procedimiento y

son responsables de la mayoría de los fracasos de la serotipificación (virus no tipificable). La serotipificación no permite distinguir a los subtipos de VHC y esta característica limita el procedimiento cuando se intenta conocer con mayor precisión las cadenas epidemiológicas que sigue el virus.

En el Centro B donde la epidemia ocurrió en 1988-89, los pacientes presentan en su mayoría serotipo 1. En el Centro A, en el cual la epidemia ocurrió en 1993, predomina el serotipo 2, infrecuente en nuestro medio. Este hecho puede tener dos causas: corresponder a la aparición posterior de este serotipo como ha sido referido por otros autores^{24,25,26} y coincidente con nuestro hallazgo de que en 6/7 pacientes con serotipo 2, la fecha de inicio de la hepatitis fue posterior a 1990 y sugerir la transmisión nosocomial intracentro dado la diferencia significativa de su prevalencia en relación al Centro B.

Las vías de transmisión nosocomial en un Centro de hemodiálisis pueden ser múltiples como ha sido señalado reiteradamente por numerosos autores^{27,28,29,30,31,32,33,34,35} y explicaría la menor prevalencia en los pacientes en diálisis peritoneal³⁶. Aún no se ha podido identificar el valor relativo de cada una de estas posibles vías de transmisión y la noción de la transmisión nosocomial surgía de hallazgos indirectos. El hallazgo de un serotipo infrecuente como el 2 en nuestro medio, en un número significativamente mayor de pacientes en un Centro de diálisis (A), nos daría evidencia de la posible contaminación nosocomial como ha sido referido por otros³⁷. Numerosas comunicaciones recientes apoyan esta hipótesis mediante el análisis filogenético de los genotipos de VHC hallados en diferentes unidades de diálisis y que permiten reconstruir la diseminación del virus en dicha área^{16,36}.

Se ha referido que los diferentes genotipos tendrían importancia en la evolución de la hepatopatía, en el riesgo de desarrollar cirrosis y hepatocarcinoma, así como en las respuestas al tratamiento^{38,39,40}, aunque no todos los autores coinciden en que estas diferencias sean significativas^{41,42,43}. Dado el predominio de serotipo 1 en los pacientes estudiados y que se realizó sólo una biopsia hepática no es posible analizar la influencia de los diferentes serotipos en la evolución de su hepatopatía. No encontramos diferencias significativas en la edad ni sexo de los pacientes según los serotipos que presentaban, al igual que otros autores¹⁶.

No encontramos diferencias en la presencia de VHC ARN (PCR) en relación a la edad, tiempo en diálisis, serotipo y niveles de TGO y TGP al corte como ya ha sido referido en otros estudios^{16,21,39,41,43,44}. Kobayashi y cols.⁴⁵ encuentran títulos significativamente mayores de ARN viral y evolución más severa de la

hepatopatía en los pacientes con genotipo 1 en relación al 2.

El mejor conocimiento de la evolución de la hepatitis por virus C en los pacientes en hemodiálisis permitirá precisar la indicación y oportunidad de tratamientos adecuados e instaurar un programa de prevención de progresión de la hepatopatía.

CONCLUSIONES

1) La frecuencia significativamente mayor del serotipo 2 en un Centro de Diálisis apoya la hipótesis de la transmisión nosocomial por tratarse de un serotipo infrecuente en el resto de la población.

2) Se destaca la importancia de la serotipificación de los VHC en los estudios epidemiológicos retrospectivos en Centros de Hemodiálisis.

Tabla III. Serotipos en pacientes en HDC

SEROTIPOS	Nº pacientes	
	PCR	
	NEGATIVO	POSITIVO
1	6	8
2	5	1
3	1	0
VARIOS	4	1
No tipificable	4	4

BIBLIOGRAFIA

- Petrosillo N, Puro V, Jagger J, Ippolito G: The risks of occupational exposure and infection by human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus in the dialysis setting. Italian Multicenter Study on Nosocomial and occupational Risk of Infections in Dialysis. *Am J Infect Control*, 23: 5, 278-285, 1995.
- Niu MT, Coleman PJ, Alter MJ: Multicenter Study of Hepatitis C Virus Infection in Chronic Hemodialysis Patients and Hemodialysis Center Staff Members. *Am J Kidney Dis* 22: 568-573, 1993.
- Dussol B, Berthezène P, Brunet P, Roubicek C, Berland Y: Hepatitis C virus infection among chronic dialysis patients in the south of France: A Collaborative Study. *Am J Kidney Dis* 25: 399-404, 1995.
- Jadoul M, Cornu C, Van Ypersele de Strihou C and the UCL Collaborative Group: Incidence and risk factors for hepatitis C seroconversion in hemodialysis: A prospective study. *Kidney Int* 4: 1322-26, 1993.
- Bhattacharjee V, Prescott LE, Pike I, Rodgers B, Bell H, El-Zayadi AR, Kew MC, Conraide J, Lin CK, Marsden H, Seed AA, Parker D, Yap PL, Simmonds P: Use of NS-4 peptides to identify type-specific antibody to hepatitis C virus genotypes 1, 2, 3, 4, 5 and 6: *J Gen Virol* 76: 1737-1748, 1995.
- Russi J, Savio E, Lowinger M, Chiparelli H, Alonso G: Sero-

tipificación de virus Hepatitis C en pacientes con alta exposición a transmisión sanguínea y donantes de sangre. *VIII Congreso Panamericano de Infectología*. Salvador, Brasil. Mayo 1997.

- Botté C, Janot C: Epidemiology of HCV infection in the general population and in blood transfusion. *Nephrol Dial Transplant* 11: 19-21, 1996.
- Murphy EL, Bryzman S, Williams AE, Co-Chien H, Schreiber GB, Ownby HE, Gilcher RO, Kleinman SH, Matijas L, Thomson RA, Nemo GJ: Demographic determinants of hepatitis C virus seroprevalence among blood donors. *JAMA*, 13: 995-1000, 1996.
- González J, Alonso A, Rodríguez C, Maertens G, Stuyver L, Vanderborcht B: HCV Genotypes in Argentina. *Seminario Internacional Genotipos HCV y sus implicancias*. Bs Aires, Argentina, marzo, 1997.
- Bassit L, Vanderborcht B, Dorlhiac-Liacer PE, Chamone AAF, Saés-Alquésar A: Anti-HCV, cPCR positivity and HCV subtypes among screening positive blood donors from Sao Paulo, Brazil. *Transfusion*, 34 S: 151,1994.
- Holland PV, Barrera JM, Ercilla MG, Yoshida CFT, Wang Y, de Olim GAB, Betlach B, Kuramoto K, Okamoto H: Genotyping hepatitis C virus isolated from Spain, Brazil, China and Macau by simplified PCR method. *J. Clin Microbiol* 34: 2372-2378, 1996.
- Registro del Grupo de Hepatitis C. Sociedad Uruguaya de Nefrología-Sociedad de Gastroenterología del Uruguay. *III Congreso Uruguayo de Nefrología*, Montevideo, Uruguay, 1995.
- Barrio V: Registro Nacional de Diálisis y Trasplante de la Sociedad Española de Nefrología. Informe 1993. Comité de Registro de la SEN. *Nefrología* 16: 307-318, 1996.
- Bouchardeau F, Chauveau P, Courouce AM, Poignet JL: Genotype distribution and transmission of hepatitis C virus in French haemodialysed patients. *Nephrol dial Transplant* 10: 2250-2252, 1995.
- Pol S, Thiers V, Noursbaum JB, Legendre C, Berthelot P, Kreis H, Brechot C: the changing relative prevalence of hepatitis C virus genotype: evidence in hemodialysed patients and kidney recipients. *Gastroenterology* 108: 581-583, 1995.
- Fabrizi F, Lunghi G, Guarnori I, Raffaele L, Erba G, Pagano A, Locatelli F: Hepatitis C virus genotypes in chronic dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 11: 679-683, 1996.
- Serebrinsky G, Scuteri R, Nembrot M, Di Gioia C, Pérez O, Elbert A, Serebrinsky R, Brukman J, Balbachan E, Feller D: Prevalencia de genotipos del virus de la hepatitis C en seis unidades de hemodiálisis. *III Congreso Iberoamericano de Nefrología*. Lisboa 1997.
- Campodónico M, Banchio C, Benetti S, Gramajo H, Taborda M, Vorobioff J, Sarano H, Rodenas O, Gavosto J, Fay F, Fay O: Presence of HCV-RNA in patients undergoing hemodialysis. Distribution of HCV genotypes in two units from the same city. *Seminario Internacional Genotipos HCV y sus implicancias*. Buenos Aires, Argentina, 21 de marzo de 1997.
- Chiparelli H, Russi J, Gadola L, Verdaguer C, Gómez T, Caorsi H, Varela A: Serotipificación del virus de la Hepatitis C en pacientes en hemodiálisis crónica y donantes de sangre en el Uruguay. *Nefrología Latinoamericana* 3: 252, 1996.
- Thomas C, Burgel L, Ribeiro L, Daglio M, Pereira M, Manzin A: Genotipificación de virus C en hemodializados crónicos. *Nefrología Latinoamericana* 3: 252, 1996.
- Al-Faleh FZ, Huraib S, Sbeih F, Al-Rashed R, Al-Mofleh IA, Sougiyyah M, Shaheen M, Ramia S: Hepatitis C virus genotypes in patients with chronic liver disease and haemodialysis patients from Saudi Arabia. *J. Viral Hepat* 2: 293-296, 1995.

22. Van Doorn LJ; Kleter B, Pike I, Quint W: Analisis of hepatitis C virus isolates by serotyping and genotyping. *J Clin Microbiol* 34: 1784-1787, 1996.
23. Rey JA, Daruich JR, Bruch Igartúa E, Schijmann A, Manero E, Findor JA: Correlation of sero and genotypes of HCV in chronic hepatitis. *Seminario Internacional Genotipos HCV y sus implicancias*. Buenos Aires, Argentina, marzo 1997.
24. Smith DB, Pathirana S, Davidson F, Lawlor E, Power J, Yap PL, Simmonds P: The origin of hepatitis C virus genotypes. *J Gen Virol* 78: 321-328, 1997.
25. Smith DB, Pontisso P: Heterogeneity of hepatitis C virus. *Baillieres Clin Gastroenterol* 10: 243-255, 1996.
26. Pawlotsky JM, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, Pellet C, Stuyver L, Duval J, Dhumeaux D: Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 171: 1607-1610, 1995.
27. Jadoul M: Transmission routes of HCV infection in dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 11: 36-38, 1996.
28. McLaughlin KJ, Cameron SO, Good T, McCrudden E, Ferguson JC, Davidson F, Simmonds P, Mactier RA, McMillan MA: Nosocomial transmission of hepatitis C virus within a British dialysis centre. *Nephrol Dial Transplant* 12: 304-309, 1997.
29. Natov SN, Pereira BJ: Hepatitis C in dialysis patients. *Adv Ren Replace Ther* 3: 275-283, 1996.
30. Gadola L, Verdaguier C, Gómez T, Cruells R, Mescia G, Caorsi H, Varela A, Russi J: Factores de riesgo de adquirir hepatitis C en centros de hemodiálisis. *Rev Med Uruguay* 11: 46-52, 1995.
31. Zeuzem S, Scheuerman EH, Waschk D, Lee JH, Blaser C, Franke A, Roth W: Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates from hemodialysis patients. *Kidney Int* 49: 896-902, 1996.
32. Arenas M, González C, Enríquez R, Cabezuelo J, Lacueva J, Antolín A, Reyes A: Eficacia del aislamiento de pacientes anti-VHC positivos en hemodiálisis. *Nefrología* XV: 141-147, 1995.
33. García-Valdecasas J, Bernal M, García F, Cerezo S: ¿Es la diálisis un factor de riesgo involucrado en la infección por el virus de la hepatitis C? *Nefrología*, XV: 610-611, 1995.
34. García-Valdecasas J, Bernal M, García F, Roldán C, Cerezo S: Factores de riesgo e incidencia de seroconversiones del virus de la hepatitis C en pacientes hemodializados. Estudio con diferentes técnicas serológicas. *Nefrología*, vol XVI: 68-73, 1996.
35. García-Valdecasas J, Bernal M, García F, Cerezo S: Virus de la hepatitis C: estado actual, avances y problemas en el diagnóstico. Transmisión en hemodiálisis. *Nefrología*, XVI: 128-1337, 1996.
36. Chan TM, Lok ASF, Cheng IKP: Hepatitis C infection among Dialysis patients: a comparison between patients on maintenance haemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 6: 944-947, 1991.
37. Sampietro M, Badalamenti S, Salvadori S, Corbetta N, Graziani G, Como G, Fiorelli G, Ponticelli C: High prevalence of a rare hepatitis C virus in patients treated in the same hemodialysis unit: evidence for nosocomial transmission of HCV. *Kidney Int* 47: 911-917, 1995.
38. Zein NN, Rakela J, Krawitt EL, Reddy KR, Tominaga T, Persing DH: Hepatitis C virus genotypes in the United States: epidemiology, pathogenicity, and response to interferon therapy. Collaborative Study Group. *Ann Intern Med* 125: 634-639, 1996.
39. Noursbaum JB, Pol S, Nalpas B, Landais P, Berthelot P, Bréchet C: Hepatitis C virus type 1b infection in France and Italy. Collaborative Study Group. *Ann Intern Med* 122: 161-168, 1995.
40. Zeinn NN, Poterucha JJ, Gross JB, Wiesner RH, Therneau TM, Gossard AA, Wendt NK, Mitchell PS, Germer JJ, Persing DH: Increased risk of hepatocellular carcinoma in patients infected with hepatitis C genotype 1b. *Am J Gastroenterol* 91: 2560-2562, 1996.
41. Romero R, Colombo M, Rumi M, Soffredini R, Del Ninno E, Donato MF, Russo A, Simmonds P: Lack of association between type of hepatitis C virus, serum load and severity of liver disease. *J Viral Hepat* 3: 183-190, 1996.
42. Benvegnú L, Pontisso P, Cavalletto D, Noventa F, Chernello L, Alberti A: Lack of correlation between hepatitis C virus genotypes and clinical course of hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hepatology* 25: 211-215, 1997.
43. Lau Jy, Davis GL, Prescott LE, Maertens G, Lindsay KL, Qian K, Mizokami M, Simmonds P: 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. Hepatitis Interventional Therapy Group. *Ann Intern Med* 124: 868-876, 1996.
44. Zeuzem S, Franke A, Lee JH, Hermann G, Ruster B, Roth WK: Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates and their correlation to viremia, liver function tests, and histology. *Hepatology* 24: 1003-1009, 1996.
45. Kobayashi M, Tanaka E, Sodeyama T, Urushihara A, Matsumoto A, Kiyosawa K: The natural course of chronic hepatitis C: a comparison between patients with genotypes 1 and 2 hepatitis C viruses. *Hepatology* 23: 695-699, 1996.