

# Alta prevalência do genótipo 1 em portadores de hepatite C crônica em Belo Horizonte, MG

## High prevalence of genotype 1 in individuals with hepatitis C in Belo Horizonte, MG

Carlos Perone<sup>1</sup>, Dora Mendez del Castillo<sup>1</sup>, Gilsimary Lessa Pereira<sup>1</sup>, Nara de Oliveira Carvalho<sup>1</sup>, José Nélio Januário<sup>1,2</sup> e Rosângela Teixeira<sup>2,3</sup>

### RESUMO

O vírus da hepatite C é caracterizado pela significativa heterogeneidade genética e é atualmente classificado em seis genótipos principais e diversos subtipos. A determinação do genótipo do vírus tem importância na prática clínica para orientar o tratamento dos pacientes portadores de hepatite C crônica. A prevalência dos diferentes genótipos e subtipos do vírus da hepatite C não tem sido amplamente estudada em algumas regiões do Brasil. Neste estudo foram analisadas 788 amostras de pacientes portadores de hepatite C crônica atendidos nos Centros de Referência em Hepatites Virais de Belo Horizonte, entre 2002 e 2006. A genotipagem do vírus foi realizada por seqüenciamento direto da região 5' UTR. Adicionalmente, foi realizada análise filogenética incluindo todas as variantes genotípicas obtidas. Observou-se alta prevalência do genótipo 1 (78,4%; 1b [40,4%], 1a [37,5%] e 1a/b [0,5%]), seguida pelo genótipo 3a (17,9%) e pelo 2b (3,1%). Foram identificadas três amostras (0,4%) com o genótipo 2a/c e duas amostras (0,2%) com o genótipo 4. A análise filogenética mostrou a segregação esperada das seqüências obtidas junto às seqüências de referência para os genótipos 1, 2, 3 e 4, exceto em duas amostras do genótipo 1a. A alta prevalência do genótipo 1 (78,4%), encontrada na população de Belo Horizonte é semelhante à previamente descrita em outras cidades, como Rio de Janeiro, mas superior à encontrada em São Paulo e no Sul do país. A presença de raras seqüências atípicas da região 5'UTR sugere a presença de variantes do vírus da hepatite C nesta população.

**Palavras-chaves:** Vírus da hepatite C/genética. Genótipo. Genoma viral. Filogenia.

### ABSTRACT

The hepatitis C virus is characterized by significant genetic heterogeneity. It is currently classified into six main genotypes and several subtypes. Determining the genotype of the virus is important in clinical practice for guiding the treatment for individuals with chronic hepatitis C. The prevalence of different genotypes and subtypes of the hepatitis C virus has not been fully studied in some regions of Brazil. In this study, 788 samples from patients with chronic hepatitis C who were attended at the Viral Hepatitis Reference Centers in Belo Horizonte were analyzed between 2002 and 2006. The genotyping of the virus was performed by direct sequencing of the 5' UTR region. Additionally, phylogenetic analysis was performed, including all of the genotypic variants obtained. High prevalence of genotype 1 (78.4%; 1b [40.4%], 1a [37.5%] and 1a/b [0.5%]) was observed, followed by genotypes 3a (17.9%) and 2b (3.1%). Three samples were identified as genotype 2a/c (0.4%) and two as genotype 4 (0.2%). The phylogenetic analysis showed the expected segregation of the sequences obtained, with regard to the reference sequences for genotypes 1, 2, 3 and 4, except for two samples of genotype 1a. The high prevalence of genotype 1 (78.4%) found in this population from Belo Horizonte was similar to previous reports from other cities such as Rio de Janeiro, but it was higher than what has been described in São Paulo and in the south of the country. The presence of rare atypical sequences from the 5' UTR region suggests that variants in the hepatitis C virus exist in this population.

**Key-words:** Hepatitis C virus/genetics. Genotype. Viral genome. Phylogeny.

O vírus da hepatite C (VHC), um membro da família *Flaviviridae* clonado por Choo e cols, em 1989<sup>8</sup>, é constituído por uma fita simples de RNA e caracteriza-se pela alta frequência de mutações e heterogeneidade genômica<sup>2,38</sup>. Algumas regiões do genoma, como E1 e E2, são altamente variáveis, enquanto outras, como a região 5' não traduzida (5'UTR) são mais estáveis<sup>30-41-42</sup>. Tem-se descrito variações de até 51% na seqüência de aminoácidos da proteína

E1 em diferentes isolados do VHC<sup>3</sup>. Estas variações na seqüência genômica ou de fragmentos genômicos permitiram classificar o vírus C em seis grandes grupos ou genótipos<sup>40</sup>. As cepas mais relacionadas dentro de cada genótipo (similaridade da seqüência de nucleotídeos entre 75% e 80%) são denominadas subtipos e são indicadas por letras<sup>38-39</sup>. Estes, por sua vez, apresentam um complexo de variantes genéticas com heterogeneidade na

1. Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 2. Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 3. Instituto Alfa de Gastroenterologia, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

**Endereço para correspondência:** Dr. Carlos Perone. R. Xavier de Gouvêia 88, 30430-710 Belo Horizonte, MG.

e-mail: carlos@nupad.ufmg.br

Recebido para publicação em: 05/03/2008

Aceito em: 05/06/2008

seqüência de nucleotídeos que varia de 1% a 9,2%. É possível que estas variantes, conhecidas como *quasispecies*, sejam resultantes de mutações acumuladas durante a replicação viral no curso da infecção crônica<sup>2 12</sup>.

A genotipagem do VHC constitui ferramenta essencial na prática clínica em razão de sua importância nas decisões terapêuticas. Os estudos clínicos têm demonstrado respostas virológicas variáveis ao tratamento da hepatite C crônica com interferon peguilado mais ribavirina com base na infecção por distintos genótipos. Assim, pacientes infectados pelo genótipo 1 apresentam respostas virológicas próximas de 50%, enquanto os infectados pelos genótipos 2 ou 3 têm mais chances de erradicar a infecção, da ordem de 80%<sup>13 15 17 23 36</sup>. A investigação do genótipo do VHC tem, ainda, importância em investigações imunológicas que visam o desenvolvimento de vacinas.

Diversos pesquisadores têm relatado ampla variação geográfica mundial na distribuição dos genótipos. Assim, os genótipos 1, 2 e 3 são mais prevalentes na Europa, Japão e Estados Unidos, o genótipo 4 na África central, Egito e Oriente Médio, o genótipo 5 na África do Sul e o genótipo 6 na Ásia<sup>25 26 27 28</sup>. No Brasil, tem-se observado maior prevalência do genótipo 1, seguido do 3<sup>4 6 32</sup>, a despeito da considerável variação na distribuição de genótipos e da insuficiência de informações em algumas regiões brasileiras<sup>1 21 24 33 37</sup>. Genótipos incomuns, como o 4 e o 5, também foram relatados esporadicamente no Brasil<sup>22</sup>. Em Minas Gerais, maior prevalência do genótipo 1 foi observada em portadores de hemofilia (84,1%)<sup>31</sup>, quando comparados aos portadores de insuficiência renal crônica em hemodiálise (66,3%)<sup>5</sup>.

O método de referência para a classificação genotípica do VHC é o seqüenciamento direto de uma região do genoma do vírus, seguido da análise filogenética da seqüência obtida<sup>39 45</sup>. As metodologias mais utilizadas para a identificação do genótipo para fins de diagnóstico baseiam-se na análise de um fragmento amplificado do genoma viral, geralmente da região não codificante 5' (5'UTR)<sup>14 16 18</sup>. Esta região, a despeito de seu alto grau de conservação, apresenta diversos polimorfismos característicos de cada grupo genético do VHC<sup>3 29 41 44</sup>.

## MATERIAL E MÉTODOS

Entre 2002 e 2006, 788 portadores de hepatite C crônica, atendidos nos Centros de Referência em Hepatites Virais do Município de Belo Horizonte foram referenciados ao NUPAD (Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, para caracterização molecular do vírus C com finalidade terapêutica. As amostras foram coletadas em tubos estéreis contendo EDTA. Os plasmas foram imediatamente separados e reservados em alíquotas de 100 microlitros congeladas a -70°C até a utilização. Em todas as amostras foi confirmada a presença do RNA do VHC através de reação em cadeia da polimerase (PCR) qualitativa (AMPLICOR®, Roche Molecular Systems), conforme especificações do fabricante.

**Seqüenciamento direto.** Do volume total de produto da PCR obtido no teste qualitativo, 150 microlitros foram

purificados utilizando-se o sistema Wizard SV® (Promega Corp.) e, posteriormente, ressuspensos em 50 microlitros de água deionizada livre de nucleases.

Em seguida, foram aplicados 4 microlitros do produto purificado em gel de agarose a 2% juntamente com padrão de peso molecular (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen Corp.) Após eletroforese, os géis foram revelados com brometo de etídio (Figura 1). As densidades ópticas das bandas produzidas pelas amostras foram comparadas à do padrão de massa com a finalidade de quantificar o DNA purificado obtido e calcular a quantidade de amostra a ser adicionada na reação de seqüenciamento.



Figura 1 - Eletroforese dos produtos de RT-PCR em gel de agarose a 2%.

As reações de seqüenciamento cíclico foram efetuadas com o sistema BigDye Terminator® (Applied Biosystems), utilizando-se na reação 4 picomoles do primer 5' AGT ACC ACA AGG CCT TTC 3'<sup>14</sup> e a quantidade de DNA necessária de acordo com a quantificação descrita. Em seguida, as amostras foram processadas no seqüenciador ABI 3100-Avant® (Applied Biosystems).

**Genotipagem.** A identificação dos genótipos foi realizada através da análise comparativa da seqüência obtida de 172 nucleotídeos (nt: 92 a 263) com seqüências de referência dos genótipos do VHC (1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 3a, 4a, 5a e 6a). Em seguida, efetuaram-se análises complementares das seqüências obtidas através do BLAST (*Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI)* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

**Análise filogenética.** Após o agrupamento das seqüências obtidas em seis grupos (1a, 1b, 2a/c, 2b, 3a e 4), foram selecionadas 34 espécies representativas das diversas variantes presentes em cada grupo. Incluíram-se, nesta seleção, todas as seqüências que apresentaram substituições em relação às de referência nos grupos 1a, 1b, 2b e 3a, e todas as seqüências dos genótipos 2a/c e 4. Estas seqüências, juntamente com as seqüências de referência obtidas do GenBank, foram submetidas a alinhamento múltiplo. Em seguida, procedeu-se à análise filogenética por matriz de distâncias com correção de Jukes-Cantor<sup>19</sup>. A árvore filogenética foi obtida pelo método de Neighbor Joining. O método de *bootstrap*<sup>11</sup> foi utilizado para testar a significância estatística para cada ramo da árvore gerada. Os valores de *bootstrap* foram obtidos por re-amostragem dos dados

com 500 replicatas. Valores de *bootstrap* menores que 50% não foram mostrados na árvore. A análise filogenética das seqüências foi executada utilizando-se o programa MEGA versão 3.1<sup>20</sup>.

Empregaram-se as seguintes seqüências de referência para a identificação genotípica e a análise filogenética: 1a: M62321 e M67463, 1b: D90208 e M58335, 2a: D00944 e AB047639, 2b: D10988 e AB030907, 2c: D50409, 3a: D17763 e D28917, 4a: Y11604, 5a: Y13184 e 6a: Y12083. As seqüências dos genótipos 5a e 6a foram incluídas com a finalidade de investigar a sua ocorrência na população brasileira.

**RESULTADOS**

De 788 amostras examinadas, 777 (98,6%) foram seqüenciadas e tiveram os genótipos determinados. Onze (1,4%) amostras apresentaram quantidade de RNA viral insuficiente para a obtenção de seqüências para análise. Os seguintes genótipos foram identificados: genótipo 1 em 609/777 (78,4%) amostras, sendo 291 (37,5%) do subtipo 1a e 314 (40,4%) do subtipo 1b, genótipo 3a em 139/777 (17,9%) amostras, 2b em 24/777 (3,1%) amostras, 4 em 2/777 (0,2%) amostras e genótipo 2 com indefinição do subtipo a ou c em 3/777 (0,4%) amostras. Quatro (0,5%) amostras classificadas como genótipo 1 apresentaram subtipagem indefinida em razão de superposição de picos (G/A) na posição 243 (Tabela 1).

A análise filogenética mostrou o agrupamento esperado das seqüências selecionadas junto às seqüências de referência para os genótipos 1, 2, 3 e 4, sendo que os valores de *bootstrap* mostraram significância estatística para os nós principais correspondentes a estes genótipos na árvore obtida (> 50% das replicatas produzidas no *bootstrap*).

As seqüências 162p e 163p, identificadas inicialmente como subtipo 1a, segregaram de forma independente no filograma, sendo estatisticamente significativa a ramificação obtida (valor de *bootstrap* de 91%). Coincidentemente, foram as duas espécies que apresentaram maior número de substituições dentro do grupo de 291 seqüências do genótipo 1a. As duas seqüências correspondentes ao genótipo 4 se agruparam conforme esperado junto ao genótipo 4a (Figura 2).

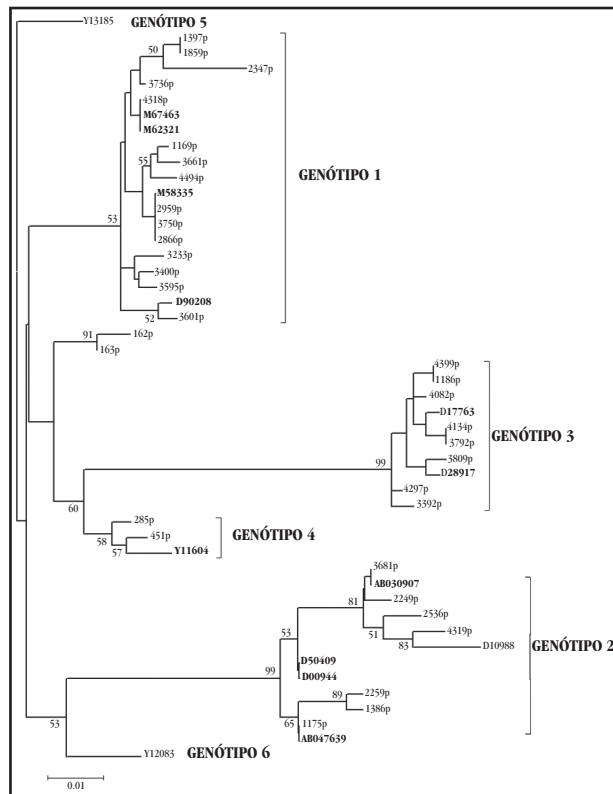
**Tabela 1 - Distribuição genotípica do vírus da hepatite C em 788 amostras analisadas no Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico, Universidade Federal de Minas Gerais, no período de 2002 a 2006.**

Genótipo do VHC	Número de Amostras (n°)	Frequência (%)
1a	291	37,5
1b	314	40,4
1a/b	4	0,5
2a/c	3	0,4
2b	24	3,1
3a	139	17,9
4	2	0,2
Total	777	100,0
Não analisadas	11	1,4
Total de amostras*	788	

VHC: vírus da hepatite C.

Genótipo do VHC: 1: a, b, a/b; 2: a/c, b; 3: a; 4:

\* cada amostra é representativa de um paciente portador de hepatite C crônica.



**Figura 2 - Filograma com base em matriz de distâncias e algoritmo neighbor joining com re-amostragem tipo bootstrap (500 replicatas) do segmento de 172 nucleotídeos estudado (posições 92 a 263) da região 5'UTR.**

Os valores de bootstrap superiores a 50% são mostrados próximos aos nós. As seqüências de referência utilizadas aparecem em negrito. As restantes são seqüências selecionadas representativas de todas as variantes obtidas dentro de cada genótipo.

**DISCUSSÃO**

Os resultados deste trabalho demonstraram alta prevalência da infecção pelo genótipo 1 nos pacientes portadores de hepatite C crônica atendidos nos Centros de Referência em Hepatites Virais no Município de Belo Horizonte. Assim, o genótipo 1 foi identificado em 78,4% das amostras dos pacientes incluídos nesta casuística.

Em investigações prévias conduzidas no Brasil, os autores demonstraram que a prevalência do genótipo 1 nas amostras testadas variou de 52,6% no Estado do Paraná<sup>6</sup> a 85% em Tocantins<sup>43</sup>. Na região Sudeste, alta prevalência do genótipo 1 foi relatada no Rio de Janeiro (79,1%), embora prevalência menor (62,5%) tenha sido descrita em São Paulo<sup>6</sup>. Em Belo Horizonte, estudos realizados em grupos específicos de portadores de infecção crônica pelo VHC reportaram prevalência do genótipo 1 com variações de 84,1% em hemofílicos<sup>31</sup> a 66,3% em portadores de insuficiência renal crônica em tratamento hemodialítico<sup>4</sup>.

Observou-se, ainda, nesta investigação, tendência ao predomínio do subtipo 1b (40,4%) comparado ao subtipo 1a (37,5%). Não obstante, este resultado deve ser analisado com cautela uma vez que a diferenciação do subtipo 1a do 1b na região 5' UTR baseia-se em um único polimorfismo (G>A) na posição 243. Este fato contribui, de acordo com alguns autores, para caracterizar erroneamente amostras do subtipo 1a como 1b<sup>7,35,42</sup>. Para verificar a ocorrência

de equívoco na subtipagem para o genótipo 1 e comprovar a proporção em que este ocorre na nossa população, seria recomendado a análise de amostras de ambos os subtipos por seqüenciamento de outra região subgenômica do vírus, o que não constituiu objetivo desta investigação.

Em amostras classificadas como genótipo 1, foram observadas quatro seqüências que apresentavam superposição A/G na posição 243 e, por esta razão, foram caracterizadas como 1a/b. É possível que a superposição observada nesta posição seja devida a co-infecção por ambos subtipos. Outra possibilidade é a presença de diferentes *quasispécies* originadas a partir do mesmo subtipo infectante<sup>7 12</sup>.

O genótipo 4, muito freqüente em alguns países da África e no Oriente Médio<sup>25 28</sup> foi identificado em duas amostras. Esta baixa prevalência da infecção pelo genótipo 4 também tem sido reportada em outros países das Américas e da Europa<sup>26 27</sup>. De forma semelhante, não foram identificados os genótipos 5 e 6. De fato, a despeito da alta prevalência descrita dos genótipos 5 na África do Sul e 6 no Sudeste Asiático, ambos são genótipos raros e pouco descritos, tanto nas Américas como no Brasil<sup>5 6</sup> e na Europa<sup>28</sup>.

O resultado da análise filogenética das 34 variantes selecionadas mostrou agrupamentos bem definidos e com significância estatística para todos os genótipos. A falta de suporte estatístico para os agrupamentos dos subtipos dentro do genótipo 1 era esperada<sup>7 14 42</sup> em função da existência de apenas uma substituição filogeneticamente informativa na região 5'UTR. As amostras 162p e 163p constituíram um grupo monofilético distinto dos seis genótipos principais; no entanto, a caracterização destas duas amostras como genótipo 1a foi concordante com os resultados obtidos no BLAST e com a maior distância apresentada em relação aos outros grupos genéticos. No Brasil, Oliveira e cols. também reportaram diferenças significativas na região 5'UTR em relação aos isolados de referência em amostras do genótipo 3<sup>31</sup>. Finalmente, as duas amostras caracterizadas como genótipo 4 se agruparam, como esperado, junto à seqüência de referência utilizada, confirmando a designação correta do genótipo para as mesmas.

Considerando que as 34 seqüências selecionadas foram representativas de todas as amostras analisadas, pode-se inferir que a análise filogenética confirmou o resultado da genotipagem em 775/777 (99,7%) amostras. Este resultado confirma que a metodologia empregada foi adequada para distinguir, com acurácia, os genótipos 1, 2, 3 e 4 do vírus C. Assim, este estudo corrobora relatos prévios de diversos autores que qualificam a região viral 5'UTR como confiável para a genotipagem do VHC<sup>9 10 14 29 34 44</sup>.

Em síntese, este estudo contribuiu para o maior conhecimento da distribuição da freqüência dos genótipos do VHC no nosso meio e reitera a confiabilidade e o bom desempenho da análise da região 5'UTR para a genotipagem do VHC. A ocorrência de seqüências atípicas em duas amostras caracterizadas como genótipo 1a sugere a presença de variantes do VHC ainda não descritas no nosso meio. Mais investigações são necessárias para ampliar o conhecimento a respeito da diversidade genômica do VHC no Brasil.

## REFERÊNCIAS

1. Bassit L, Ribeiro dos Santos G, Da Silva IC, Takei K, Villaça P, David Neto E, Chamone D, Saez Alquezar A. Genotype distribution of hepatitis C virus in São Paulo, Brazil: Rare subtype found. *Hepatology* 29: 994-995, 1999.
2. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Seminars in liver disease* 15: 41-63, 1995.
3. Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 89: 4942-4946, 1992.
4. Busek S, Oliveira G. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in Brazil. *Genetics and Molecular Research* 2: 117-123, 2003.
5. Busek SU, Babá EH, Tavares Filho HA, Pimenta L, Salomão A, Corrêa-Oliveira R, Oliveira GC. Hepatitis C and hepatitis B virus infection in different hemodialysis units in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 775-778, 2002.
6. Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, Silva LC, Souto FJ, Spinelli V, Pereira LM, Coelho HS, Silva AO, Fonseca JC, Rosa H, Lacet CM, Bernardini AP. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38: 41-49, 2005.
7. Chen Z, Weck KE. Hepatitis C Virus Genotyping: Interrogation of the 5' Untranslated Region Cannot Accurately Distinguish Genotypes 1a and 1b. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 3127-3134, 2002.
8. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359-362, 1989.
9. Davidson F, Simmonds P, Ferguson JC, Jarvis LM, Dow BC, Follett EA, Seed CR, Krusius T, Lin C, Medgyesi GA. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. *Journal of General Virology* 76: 1197-1204, 1995.
10. Doglio A, Laffon C, Thyss S, Lefebvre JC. Rapid genotyping of hepatitis C virus by direct cycle sequencing of PCR-amplified cDNAs and capillary electrophoresis analysis. *Research in Virology* 149: 219-227, 1998.
11. Felsenstein J. Confidence Limits on Phylogenies: an Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39: 783-791, 1985.
12. Forns X, Purcell RH, Bukh J. Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. *Trends in Microbiology* 7: 402-410, 1999.
13. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçales Jr FL, Häussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *New England Journal of Medicine* 347: 975-982, 2002.
14. Germer JJ, Rys PN, Thorvilson JN, Persing DH. Determination of Hepatitis C Virus Genotype by Direct Sequence Analysis of Products Generated with the Amplicor HCV Test. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 2625-2630, 1999.
15. Hadziyannis SJ, Sette Jr H, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer H Jr, Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM, PEGASYS International Study Group. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Annals of Internal Medicine* 140: 346-355, 2004.
16. Halfon P, Trimoulet P, Bourliere M, Khiri H, de Lédighen V, Couzigou P, Feryn JM, Alcaraz P, Renou C, Fleury HJ, Ouzan D. Hepatitis C Virus Genotyping Based on 5' Noncoding Sequence Analysis (Trugene). *Journal of Clinical Microbiology* 39: 1771-1773, 2001.
17. Hnatyszyn HJ. Chronic hepatitis C and genotyping: the clinical significance of determining HCV genotypes. *Antiviral Therapy* 10: 1-11, 2005.
18. Holland J, Bastian I, Ratcliff RM, Beers MY, Haehsy P, Harley H, Shaw DR, Higgins GD. Hepatitis C genotyping by direct sequencing of the product from the Roche Amplicor test: Methodology and application to a South Australian population. *Pathology* 30: 192-195, 1998.
19. Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules. In: *Munro HN (ed) Mammalian protein metabolism*, Academic Press, New York, p. 21-123, 1969.
20. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150-163, 2004.

21. Krug LP, Lunge VR, Ikuta N, Fonseca AS, Cheinquer H, Ozaki LS, Barros SG. Hepatitis C virus genotypes in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 29: 1629-1632, 1996.
22. Levi JE, Takaoka DT, Garrini RH, Fachini RM, Focaccia R, de Bortholi Santos E, Mitre HP, de Mendonça JS, de Paula Cavalheiro N, Barone AA, Wendel S. Three Cases of Infection with Hepatitis C Virus Genotype 5 among Brazilian Hepatitis Patients. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 2645-2647, 2002.
23. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358: 958-965, 2001.
24. Martins RMB, Teles SA, Freitas NR, Motta-Castro ARC, Souto EJD, Mussi A, Amorim RMS, Martins CRE. Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors from mid-west region of Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 48: 53-55, 2006.
25. McOmish F, Yap PL, Dow BC, Follett EAC, Seed C, Keller AJ, Cobain TJ, Krusius T, Kolho E, Naukkarinen R, Lin C, Lai C, Leong S, Medgyesi GA, Héjjas M, Kiyokawa H, Fukada K, Cuyppers T, Saeed AA, Al-Rasheed AM, Lin M, Simmonds P. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 884-892, 1994.
26. Mellor J, Holmes EC, Jarvis LM, Yap PL, Simmonds P, International HCV Collaborative Study Group. Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. *Journal of General Virology* 76: 2493-2507, 1995.
27. Nainan OV, Alter MJ, Kruszon-Moran D, Gao FX, Xia G, McQuillan G, Margolis HS. Hepatitis C virus genotypes and viral concentrations in participants of a general population survey in the United States. *Gastroenterology* 131: 478-484, 2006.
28. Nguyen MH, Keefe EB. Prevalence and treatment of hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 3: 97-101, 2005.
29. O'Brien CB, Henzel BS, Wolfe L, Gutekunst K, Moonka D. cDNA sequencing of the 5' noncoding region (5'NCR) to determine hepatitis C genotypes in patients with chronic hepatitis C. *Digestive Diseases and Sciences* 42: 1087-1093, 1997.
30. Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Yotsumoto S, Tanaka T, Yoshizawa H, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. The 5' terminal sequence of the hepatitis C virus genome. *Japanese Journal of Experimental Medicine* 60: 167-177, 1990.
31. Oliveira GC, Carmo RA, Rocha MO, Silva MO, Lima AT, Guimarães MD, Correa-Oliveira R. Hepatitis C virus genotypes in hemophiliacs in the State of Minas Gerais, Brazil. *Transfusion* 39: 1194-1199, 1999.
32. Oliveira ML, Bastos FI, Sabino RR, Patzold U, Schreier E, Pauli G, Yoshida CFT. Distribution of HCV genotypes among different exposure categories in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32: 279-282, 1999.
33. Paraná R, Vitvitski L, Berby F, Portugal M, Cotrim HP, Cavalcante A, Lyra L, Trego C. HCV Infection in Northeastern Brazil: unexpected high prevalence of genotype 3a and absence of African genotypes. *Arquivos de Gastroenterologia* 37: 213-216, 2000.
34. Ross RS, Viazov SO, Holtzer CD, Beyou A, Monnet A, Mazure C, Roggendorf M. Genotyping of hepatitis C virus isolates using CLIP sequencing. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 3581-3584, 2000.
35. Sandres-Sauné K, Deny P, Pasquier C, Thibaut V, Duverlie G, Izopet J. Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region. *Journal of Virological Methods* 109: 187-193, 2003.
36. Scott JD, Gretch DR. Molecular diagnosis of hepatitis C virus. *Journal of the American Medical Association* 297: 724-732, 2007.
37. Silva LK, Paraná R, Souza SP, Berby F, Kay A, Trepó C, Santana N, Cotrim H, Lyra LG, Reis MG. Hepatitis C Virus Genotypes in a Northeastern area of Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62: 257-260, 2000.
38. Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 21: 570-583, 1995.
39. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspé G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin-I T, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A. Consensus Proposals for a Unified System of Nomenclature of Hepatitis C Virus Genotypes. *Hepatology* 42: 962-973, 2005.
40. Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *Journal of General Virology* 74: 2391-2399, 1993.
41. Simmonds P, McOmish F, Yap PL, Chan SW, Lin CK, Dusheiko G, Saeed AA, Holmes EC. Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. *Journal of General Virology* 74: 661-668, 1993.
42. Smith DB, Mellor J, Jarvis LM, Davidson F, Kolberg J, Urdea M, Yap PL, Simmonds P. Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. *Journal of General Virology* 76: 1749-1761, 1995.
43. Souza KP, Luz JA, Teles SA, Carneiro MA, Oliveira LA, Gomes AS, Dias MA, Gomes SA, Yoshida CF, Martins RM. Hepatitis B and C in the Hemodialysis Unit of Tocantins, Brazil: Serological and Molecular Profiles. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 599-603, 2003.
44. Stuyver L, Wyseur A, van Arnhem W, Lunel F, Laurent-Puig P, Pawlotsky JM, Kleter B, Bassit L, Nkengasong J, van Doorn LJ, Maertens G. Hepatitis C virus genotyping by means of 5'-UR/core line probe assays and molecular analysis of untypeable samples. *Virus Research* 38: 137-157, 1995.
45. Zein NN. Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. *Clinical Microbiology Reviews* 13: 223-235, 2000.