

基因 I、II 型戊型肝炎病毒高灵敏度通用引物的设计和初步应用

葛胜祥, 郭清顺, 李少伟, 张军, 夏宁邵

(福建省医学分子病毒学研究中心, 厦门大学 361005)

摘要:设计针对国内流行的戊型肝炎病毒(HEV)基因 I、II 型,在这两型序列的保守区域设计了一套 RT-PCR 引物——E 引物,并将 E 引物与目前较常用的 3 对通用引物(Meng、ConORF1 和 ConORF2 引物)比较了检测基因 I、II 型 HEV 的灵敏度。对基因 I 型 HEV, E 引物能检出的稀释度为 10^5 , 参考引物能检出的稀释度为 $10^2 \sim 10^4$; 对基因 II 型 HEV, E 引物能检出的稀释度为 10^2 , 参考引物能检出的稀释度为 $10^1 \sim 10^2$ 。在 17 份 HEV-IgM 阳性血清中, E 引物检出 5 份, 检出率为 29.4%; 参考引物只能检出 1 份或 2 份, 检出率最高为 11.8%。E 引物在 33 份 HEV-IgM 阳性的隐性感染血清中检出 6 份, 阳性率 18.2%; 在 79 份 HEV-IgM 阳性的临床肝炎血清中检出 36 份, 阳性率 45.6%。以上结果初步表明, 对于在国内流行的基因 I、II 型 HEV, E 引物的检测灵敏度要高于目前常用的通用引物。
关键词:戊型肝炎病毒; 基因 I 型; 基因 II 型; 聚合酶链反应; 通用引物

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8721(2005)03-0181-08

戊型肝炎病毒(Hepatitis E virus, HEV)是经肠道传播的非甲非乙型肝炎的主要病原体之一^[1],既可以引起大规模的暴发和流行^[2-5],也可以引起散发型病例^[6-8]。RT-PCR 是 HEV 感染确诊的重要手段之一。HEV 为单链 RNA 病毒,其基因虽说相对稳定,同一次暴发不同毒株间同一性高,在猕猴中多次传代基因不易漂移^[9],但不同地域分离株间基因变异较大,因此保守引物的选择成了 PCR 诊断灵敏度的关键。

检测临床标本中 HEV RNA 的通用引物已有一些报道,扩增的目的片段主要集中于 ORF1 的 5 端和 ORF2 中部这两个保守区域。Meng 等^[10]于缅甸株 5 687 ~ 6 319nt 的位置设计了一套套式 PCR (nPCR)引物,并于美国猪中分离出首株动物源性 HEV RNA。尔后, Wang 等^[11]用该引物于中国家畜中检出多株 HEV RNA。Li 等^[12]用该引物分析了中国 14 个城市戊型肝炎(戊肝)患者 HEV 基因的变异。Wang 等^[13]于两个保守区域设计了另两套通用引物——ConORF1 和 ConORF2,这是目前应用最广的引物之一^[14-20]。笔者为了检测中国不同地区戊肝散发病例和隐性感染者,分别合成了上述 3 套引物,但在实际应用中检出率不尽如人意。因

此,笔者针对目前国内只报道过基因 I 型和 II 型的事实,设计和评价了一套以 I、II 型为主兼顾 I、II 型的通用引物,并初步应用于临床标本中 HEV RNA 的检测。

材料与方法

1 血清标本 收集抗 HEV-IgM^[21]阳性的健康献血员血清 33 份,临床急性戊肝血清 79 份。健康献血员血清来源于湖州血站。79 份临床急性戊肝血清中,43 份来自广西疾病预防控制中心肝炎室,15 份来自北京地坛医院,21 份来自北京佑安医院。

2 粪便标本 基因 I、II 型粪便均来自广西疾病预防控制中心试验感染猴。

3 引物合成 根据文献报道的通用引物序列(Meng 等^[10]:引物 3156、3157、3158、3159; Wang 等^[11]:引物 ConORF1s1、ConORF1a1、ConORF1s2、ConORF1a2; 引物 ConORF2s1、ConORF2a1、ConORF2s2、ConORF2a2),由上海博亚公司合成 3 套套式 PCR 引物,分别由 2 条正向引物和 2 条反向引物组成。将 33 条全长的 HEV 序列用 MegAlign 中 Clustal 算法同源列队后,于 I、II 型保守处设计出一套 nPCR 的引物,并命名为 E(表 1)。为了避免一条引物内出现太多的简并碱基,将引物 E4 分成两条设计,这两条引物位置相同,但针对的变异株不同,前一条主要针对基因 I 型,后一条主要针对基因 II 型。使用时将这两条引物等量混合作为 nPCR 的内侧反向引物。

4 RT-PCR 检测和测序 取 250 μ l 血清,用 Trizol 试剂(GIBCO 公司)按其操作说明提取,20 μ l 体积反转录。Meng、ConORF1 和 ConORF2 引物按参考文献提供的方法操作^[10,11]。E 引物 RT-PCR 程序为:用 E5 作反转录引物,

收稿日期:2004-09-07;修回日期:2004-12-14

基金项目:福建省科技重大专项(2004YZ01)。

作者简介:葛胜祥(1976-),男,博士研究生。

通讯作者:夏宁邵,361005 厦门大学福建省医学分子病毒学研究中心。(E-mail: nsxia@jingxian.xmu.edu.cn)

表 1 HEV RT-PCR 引物序列

Table 1 The primers sequences for HEV RT-PCR

Primer	Sequence [#]	Site [*]
E1	CTGTTTAA YCTTGCTGACAC	6260-6279nt
E2	GACAGAATTGATTTTCGTCG	6298-6316nt
E4-1	TGTTGGTTRTCAATACTCTG	6486-6467nt
E4-4	TGCTGTTATCGTAACTCTG	6486-6467nt
E5	WGARAGCCAAA GCACATC	6568-6551nt

#. Y=C/T, R=A/G, W=A/T.

*. Sites on the genome of Burma strain (GeneBank accession number: D10330).

AMV 反转录酶 42 反转录 40min。第一轮 PCR 引物为 E1、E5,反转录模板加 2μl,总体积为 20μl;94 预变性 5min;94 变性 30s,53 复性 30s,72 延伸 40s,35 个循环;72 延伸 5min。第二轮 PCR 引物为 E2、E4,加 2μl 第一轮产物为模板,总体积为 20μl;94 预变性 5min;94 变性 30s,53 复性 30s,72 延伸 40s,35 个循环;72 延伸 5min。E 引物扩增片段用胶回收试剂盒(上海华舜公司)回收纯化,连接入 pMT-18 载体(大连宝生物公司),由上海博亚公司进行序列测定。从湖州地区无偿献血员中分离出的毒株片段的命名以“hz”开始;从南宁地区戊肝患者中分离出的毒株命名以“n”或“NN”开始;从北京地坛医院或北京佑安医院戊肝患者中分离出的毒株命名分别以“DT”或“YA”开始。

5 同源性分析与进化树生成 同源性分析参比的 33 株 HEV 全长序列如下:缅甸株(B1, GenBank 录入号为

D10330; B2, M73218), 巴基斯坦株(P1, M80581; P2, AF185822), 印度株(I1, X98292; I2, X99441; I3, AF076239; I4, AF459438), 中国株(C1, D11092; C2, D11093; C3, L08816; C4, L25547; C5, M94177; Cv1, AB108537; Cv2, AJ272108), 乍得株(Chad1, AY204877), 墨西哥株(M1, M74506), 美国株(Us1, AF060668; Us2, AF060669), 日本株(J1, AB074918; J2, AB074920; J3, AP003430; J4, AB099347; J5, AB091394; J6, AB097812; J7, AB080575; J8, AB074917; J9, AB074915), 美国猪株(swUS1, AF082843), 加拿大猪株(swCa1, AY115488), 日本猪株(swJa1, AB073912; swJa2, AB097811)。各序列采用 MegAlign (Lasergene 软件包, Dnastar Inc) 进行同源列队。同源队列用 MEGA 软件包(3.0 Beta version, www.megasoftware.net) 中的 Neighbor-Joining 法(Kimura-2-parameter 模型)生成进化树,并用 Bootstrap 法(Replication 值为 250)验证。Bootstrap 值大于 70% 的系统进化分组被认为有足够的支持证据。

结 果

1 引物分析

1.1 E 引物的同源性和特异性分析 E1 引物第 9 位的兼并碱基,是 15 条基因型全长序列和 8 条基因型全长序列的主要变异位点(图 1)。就全部 4

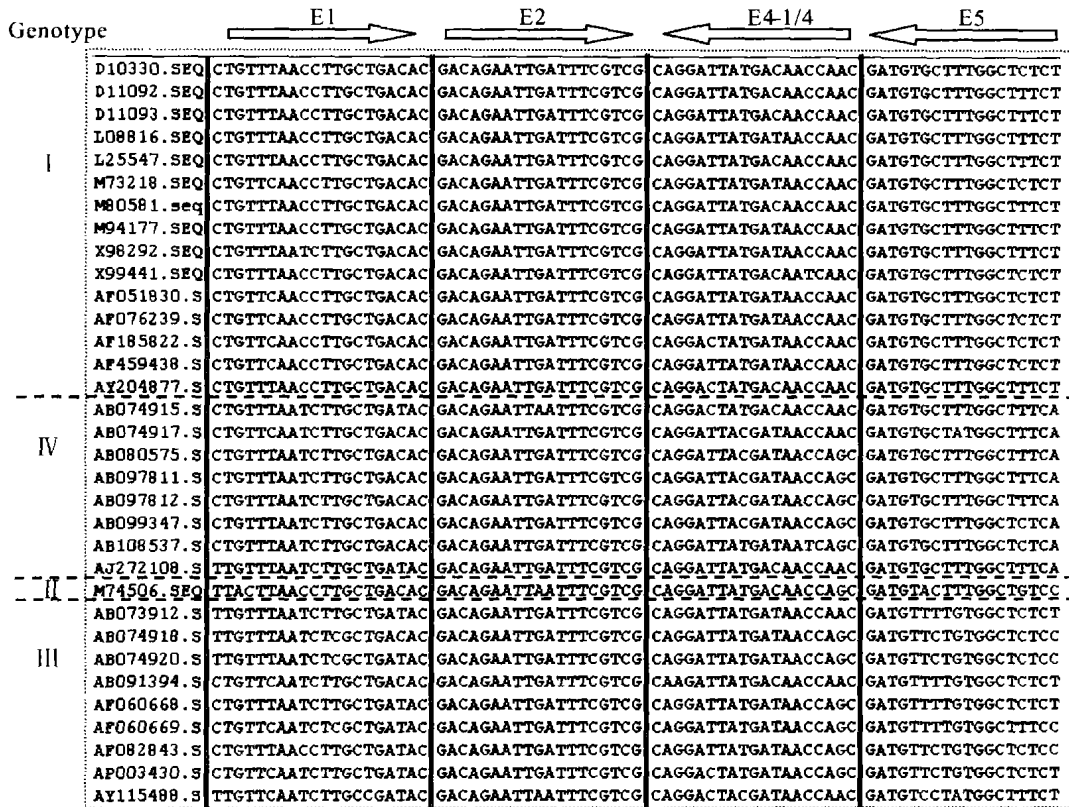


图 1 E 引物与 33 条 HEV 全基因序列的同源比较

Figure 1 The homologous comparison of E primer set with the genomes of thirty-three HEV strains

个基因型而言,E1 3 端的第 3 个碱基也是一个高变位点。E1 在基因、型序列中保守,但与型同源性较差。E2 引物除了第 10 位 G 有零星突变为 A 外,在 4 个基因型中均保守。E4 引物 3 端第 6 个碱基在少数序列中有突变外,其余的 4 个基因型序列均能与此混合引物很好配对。E5 引物能与全部 23 条、型序列配对,但其 3 端在、型中变异大。因此,E 引物适合于检测、型 HEV 序列。

同时,为了检验引物的特异性,将此四条引物于 GenBank 数据库进行 BLAST 分析,并未发现能配对非 HEV 序列,表明此引物的特异性较好。

1.2 E 引物的基本参数分析 为了解 E 引物的基本理化性质,用软件 Oligo6.0 分析了引物的解链温度(Tm)、Loop 值(Loop Tm)以及 GC 含量(表 2)。可见各引物的 GC 含量和 Tm 值适中,且在配对的

两条引物间相差无几;各引物均未有明显的 Loop 结构。同时,Primer 软件分析结果显示,各引物自身和引物间二聚体的形成不明显。

表 2 E 引物的 Tm 值、Loop 值和 GC 含量

Table 2 Tm, Loop Tm and GC % of E primers

Primer	Length (bp)	Tm (°C)	Loop Tm (°C)	GC %
E1	20	54.9 - 57.6	—	40 - 45
E5	18	55.9 - 56.8	—	44.4 - 50
E2	19	57.7	3	42.1
E4	20	58.0 - 60.9	—	35 - 45

1.3 目的片段的同源性分析 为了确定 E 引物扩增出来的片段能否用于基因分型,我们将上述 33 株全长 HEV 序列 ORF2 的相应区段(6 317 ~ 6 466nt, 共 150bp)进行同源性分析,绘制进化树,并与根据全长序列生成的进化树进行比较。

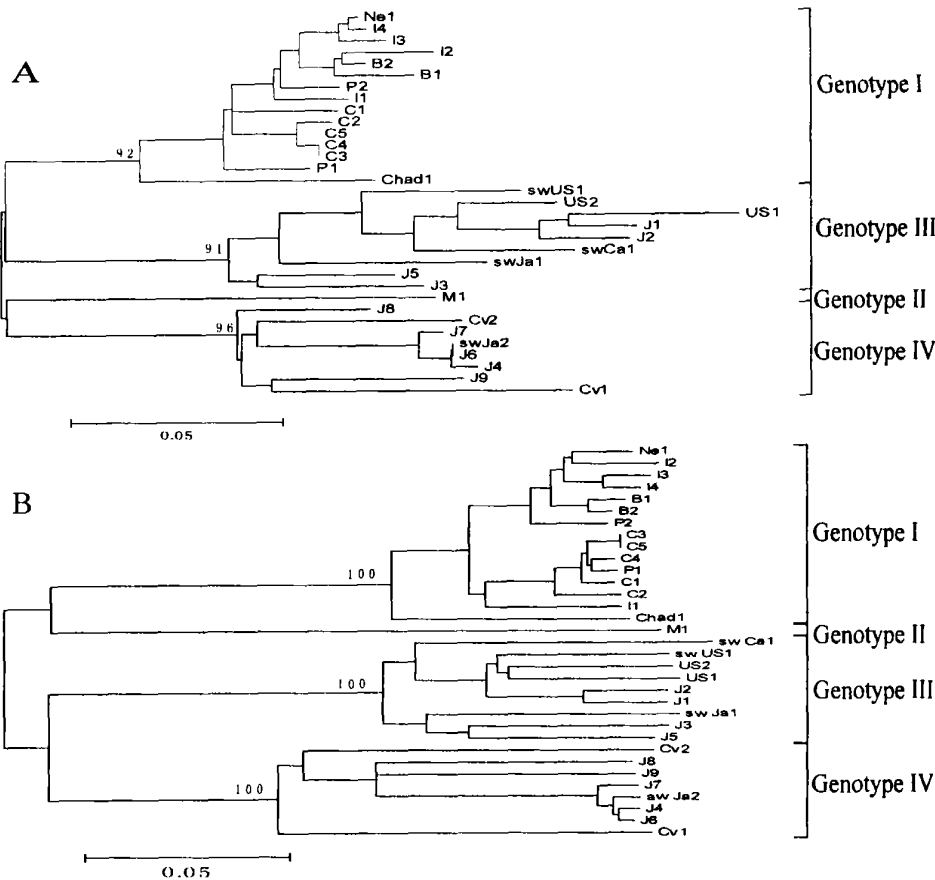


图 2 E 引物扩增片段绘制的进化树(A)与 HEV 基因组进化树(B)的比较

Figure 2 Comparison of nucleotide phylogenetic trees protracted by the amplified fragments of E primer set (A) and by the complete genomes of HEV (B)

Details and accession numbers for the sequences used for comparison are provided in Materials and Methods.

从图 2 可以看出,E 引物扩增的目的片段与全基因组绘制的系统树不完全一致,但分型结果完全

一致。Schlauder 等^[22]曾将与 E 引物扩增片段几近相同的 148bp 的 ORF2 片段(6 322 ~ 6 469nt)用于

HEV 各分离株的同源性分析,也得出同样的结果。此外,一个包含于 E 引物目的片段中的更小片段(6 369 ~ 6 466nt, 98bp)也常用于 HEV 的序列分析^[13]。

2 与已报道引物的比较

为了遴选更适合于诊断中国境内的临床戊型肝炎(以基因 I 型和基因 IV 型为主)的引物,比较了 E 引物和目前被广泛应用的、已报道的通用引物(Meng 引物, ConORF1 引物和 ConORF2 引物)对已知 I 型和 IV 型 HEV 的扩增效率,并同时评价这些引物在 17 份抗-HEV IgM 抗体阳性的随机血清中的检出率。

2.1 扩增效率比较 将两份分别含基因 I 型和 IV 型 HEV 的猕猴粪便,用 PBS(20mmol/L, pH7.2)制成 10% 的粪悬液上清,再梯度稀释 10¹ ~ 10⁶ 倍,分别用上述四种引物检测梯度稀释液中的 HEV,结果如表 3。对基因 I 型 HEV 的检测, E 引物的灵敏度均要高于其它 3 对引物;对基因 IV 型 HEV 的检测, E 引物的灵敏度与 Meng 引物和 ConORF1 引物持平,要高于 ConORF2 引物。

表 3 不同引物对基因 I、IV 型 HEV 的扩增灵敏度比较

Table 3 Comparison of the sensitivity of different primer sets on PCR detecting of genotype I or IV HEV

HEV	Primer			
	Meng	ConORF1	ConORF2	E
Genotype I	10 ⁴	10 ⁴	10 ²	10 ⁵
Genotype IV	10 ²	10 ²	10 ¹	10 ²

2.2 检出率的比较 从广西省疾病预防控制中心提供的 HEV-IgM 阳性临床肝炎血清中随机选取 17 份标本,并用上述 4 对引物平行检测其中的 HEV

表 5 不同来源抗 HEV-IgM 阳性血清中的 E 引物 PCR 结果

Table 5 The PCR result using E primer set on different clinical sera with anti-HEV IgM

Source of sera	Clinical status	Tested no.	Positive no.			Positive rate (%)
			Total	Genotype I	Genotype IV	
Blood bank	Subclinical	33	6	4	2	18.2
Hospital A	Acute hepatitis	36	12	1	11	33.3
Hospital B	Acute hepatitis	7	6	0	6	85.7
Hospital C	Acute hepatitis	15	9	2	7	60.0
Hospital D	Acute hepatitis	21	9	0	9	42.9
Total	Subclinical	33	6	4	2	18.2
	Acute hepatitis	79	36	3	33	45.6

7 个基因 I 型的序列分别来源于北京(医院 C 和 D)、浙江(血站)和广西(医院 A),相互间同源性为 96.7% ~ 100%,表明在各地引起隐性感染和临床散发病例的 I 型分离株变异不大,与 HEV 4 个基

RNA。E 引物检出了其中 5 份,分别为 n3、n6、n7、n8 和 n9;其它引物的检出数均要少于 E 引物,且阳性标本均在 E 引物检出的 5 份标本之内。现将这 5 份标本各引物检测的结果列于表 4。E 引物的阳性率为 29.4%,要明显高于其它 3 对引物,同时也要高于 ORF1 和 ORF2 保守区引物联用方案。将 5 份标本用 E 引物扩增的 PCR 产物测序,并将其序列进行进化树分析,其中有 4 份为基因 I 型,仅标本 n9 为基因 IV 型。可见, E 引物比目前所发表的通用引物更适合于对基因 I、IV 型 HEV 的检测。

表 4 四种引物对 17 份 HEV-IgM 阳性临床肝炎标本的检出情况

Table 4 The PCR results of 17 HEV-IgM reactive clinical serum samples amplified with four primer sets

Primer set	Tested no.	Positive sample					Positive rate (%)
		n3	n6	n7	n8	n9	
Meng	17	-	+	-	-	-	5.9
ConORF1	17	-	+	-	+	-	11.8
ConORF2	17	-	-	-	+	-	5.9
E	17	+	+	+	+	+	29.4

3 E 引物的初步临床应用

共收集了 HEV-IgM 阳性的 79 份散发型肝炎的临床血清和 33 份 ALT 正常的献血员血清(隐性感染者),并用 E 引物对这些标本做 PCR 筛查并将 PCR 产物测序并做进化树分析,结果如表 5、图 3。在 33 份 HEV-IgM 阳性的隐性感染标本中有 6 份 HEV PCR 阳性,阳性率 18.2%。在不同次收集的临床肝炎标本中,PCR 阳性率从 33.3% ~ 85.7% 不等,平均达 45.6%。在总共 36 份 HEV PCR 阳性的临床标本中,33 份为基因 I 型,占 90% 以上。

因型中 IV 型最为保守的看法一致。而属于基因 I 型的 35 个序列变异大,相互间同源性为 84% ~ 100%,并有一定的地域性:来自北京(医院 C 和 D)的分离株相互接近,而来自广西(医院 A 和 B)的分

离株也相互聚集(图 3)。大体可以将基因型分离株分为两个群, Group 1 和 Group 2, 但 Bootstrap 分析只支持 Group 1 的分群 (Group 1 的 Bootstrap 值为 100%)。Group 1 包括 7 株分离自北京的毒株和参考序列 Cv1, 群内同源性的 92.7% ~ 100%; Group 2

群内序列变异较大, 同源性从 88.6% 到 100% 不等, 并且 Bootstrap 分析不支持其分群, 但因其群内序列与 Group 1 群内序列的差异较大, 群间同源性为 84% ~ 90.7%, 因此与 Group 1 对应, 将其定义为一个群。

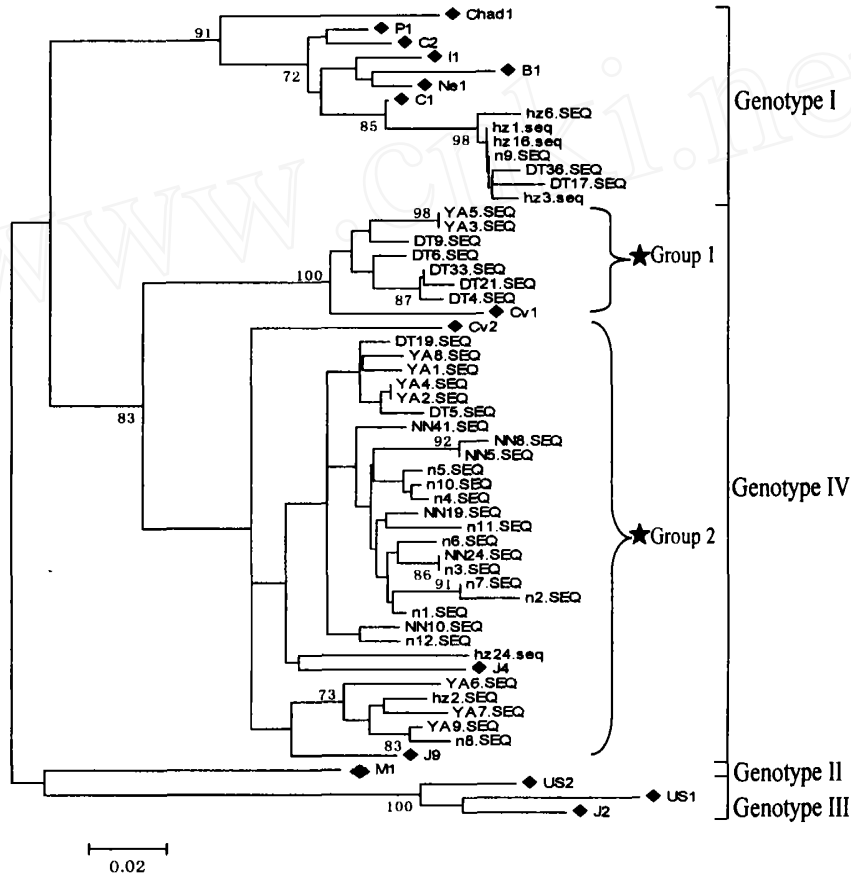


图 3 42 份 E 引物阳性标本的进化树分析

Figure 3 Phylogenetic analysis of forty-two E primer set detected samples

represent the reference sequences, their details and accession numbers are provided in Materials and Methods.

讨 论

目前,一般将 HEV 分为 4 个主要的基因型:基因型 I 流行于亚非多数国家,以缅甸株为原型株;墨西哥株为基因型 II,此外还包括尼日利亚株^[23]和新近于纳米比亚发现的两株^[24];从美国、部分欧洲国家(意大利、希腊、西班牙等)和阿根廷的急性戊肝患者中分离的 HEV 株^[14-16, 25, 26]是为基因型 III;基因型 IV 由最近在中国发现的新的分离株组成^[13],包括中国台湾株^[27]和部分日本株^[7]。4 个基因型间的 HEV 序列的同源性小于 81%,而在各基因型内部,除了基因型 I 各序列间的同源性高于 90%外,其它各型变异均较大^[22]。基因型 I 的纳米比亚株、

墨西哥株、尼日利亚株三者间的同源性为 80% ~ 90%^[23, 24];Schlauder 等^[22]将 2001 年前发表的基因型 I 序列分为 5 个亚型,各亚型间的同源性小于 88%;基因型 II 与基因型 I 一样,目前只报道过散发型病例,其变异度也较大,一些日本的分离株与 Wang 等报道的基因型 I 原型株(中国变异株)的同源性小于 90%。

目前较多报道的 HEV PCR 引物有 Meng、ConORF1 和 ConORF2。Meng 引物是 Meng 等^[10]于 1997 年为了克隆美国本土 anti-HEV 抗体阳性的猪中的 HEV 序列设计的通用引物。由于当时基因型 III 还未发现,其设计引物的参考序列主要为基因型 I、II 和少量的 III 型。通过与上述的 33 条全长序列对比,此套引物中的某些引物的 3 端与几乎全

部 8 条 型序列出现了不匹配。1999 年, Wang 等^[13]为了检测多份采集于国内的非甲-戊型临床散发型急性肝炎标本, 分别在 HEV ORF1 和 ORF2 的两个保守区设计了 ConORF1 和 ConORF2 两套引物。此次试验首次发现了 HEV 基因 型序列, 但在设计引物时没有也不可能考虑到基因 型。与 33 条全长序列的同源性分析表明, ConORF1 的两条正向引物同源性较高, 在 4 个基因型中变异不大, 但两条反向引物的 3 端在几乎所有的 型序列中出现了 1~2 个碱基的突变。ConORF2 的外侧反向引物 3 端的第 6 个碱基在 8 个 型序列中有 5 株出现突变, 其内侧反向引物在外侧反向引物的基础上仅有 3 个碱基的位移, 不仅同样有不匹配的问题, 还会导致一定的假阳性。

本研究设计的 E 引物的扩增区段与 ConORF2 大致相同, 且有两条引物的位置相同。但 E 引物在设计时参考了大量的 型序列并放弃了与众多 型序列的匹配, 虽然降低了引物的通用性, 但在以流行 HEV 基因 型和 型为主的区域应用时拥有更大的优势。这一优势在平行检测 17 份 HEV-IgM 阳性血清时, E 引物比其它引物明显要高的阳性率得到了验证。

在以往的报道中^[12, 13, 28], 国内散发性临床戊型肝炎中基因 型所占的比率从 9% 到 62.5% 不等, 总体上基因 型和 型的比例大致相当。在本研究中, 基因 型比率达到了 91.7% (33/36), 明显要比以往报道的要高。其原因可能与选择的样本有关, 也可能是 E 引物进一步提升了对基因 型的检出率。

本研究从北京地区戊肝患者中分离出的 18 株 HEV 中, 16 株属于基因 IV 型; 广西地区戊肝患者中分离的 18 株 HEV 中, 17 株属于基因 IV 型。最近, 郑玲等^[29]用 E 引物检测了福州市传染病医院自 2000 年 1 月到 2003 年 12 月收集的 158 份 HEV-IgM 阳性的临床肝炎血清, 共检出 81 份 PCR 阳性, 阳性率 51.27%, 与本研究接近。这 81 株均属于基因 IV 型。但本研究从湖州地区献血员中分离出的 6 株序列中, 仅 2 株属于基因 IV 型, 而 4 株属于基因 I 型。这是由于湖州地区毒株基因型分布的特殊性, 还是有其它原因? 这一问题值得进一步深入研究。

参考文献:

[1] Purcell R H, Emerson S U. Hepatitis E virus[A]. Edited by Knipe

D M, Howley P M, Griffin D E, et al. Fields Virology[M]. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000. 3051 - 3061

- [2] Khuroo M S. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type[J]. *Am J Med*, 1980, 68: 818 - 824.
- [3] Arora N K, Panda S K, Nanda S K, et al. Hepatitis E infection in children: study of an outbreak[J]. *J Gastroen Hepatol*, 1999, 14: 572 - 577.
- [4] Naik S R, Aggarwal R, Salunke P N, et al. A large waterborne viral hepatitis E epidemic in Kanpur, India[J]. *Bull WHO*, 1992, 70: 597 - 604.
- [5] Velasquez O, Stetler H C, Avila C, et al. Epidemic transmission of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in Mexico, 1986 - 1987[J]. *JAMA*, 1989, 263: 3281 - 3285.
- [6] Tokita H, Harada H, Gotanda Y, et al. Molecular and serological characterization of sporadic acute hepatitis E in a Japanese patient infected with a genotype hepatitis E virus in 1993[J]. *J Gen Virol*, 2003, 84: 421 - 427.
- [7] Takahashi M, Nishizawa T, Yoshikawa A, et al. Identification of two distinct genotypes of hepatitis E virus in a Japanese patient with acute hepatitis who had not traveled abroad[J]. *J Gen Virol*, 2002, 83: 1931 - 1940.
- [8] Kabrane-Lazizi Y, Zhang M D, Purcell R H, et al. Acute hepatitis caused by a novel strain of hepatitis E virus most closely related to United States strains[J]. *J Gen Virol*, 2001, 82: 1687 - 1693.
- [9] Arankalle V A, Paranjape S, Emerson S U, et al. Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates from India (1976 - 1993) [J]. *J Gen Virol*, 1999, 80: 1691 - 1700.
- [10] Meng X J, Purcell R H, Halbur P G, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 9860 - 9865.
- [11] Wang Y C, Zhang H Y, Xia N S, et al. Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China[J]. *J Med Virol*, 2002, 67: 516 - 521.
- [12] Li K, Zhuang H, Zhu W F. Partial nucleotide sequencing of hepatitis E viruses detected in sera of patients with hepatitis E from 14 cities in China[J]. *Chin Med J*, 2002, 115(7): 1058 - 1063.
- [13] Wang Y C, Ling R, Erker J C, et al. A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis[J]. *J Gen Virol*, 1999, 80: 169 - 77.
- [14] Schlauder G G, Desai S M, Zanetti A R, et al. Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: evidence for additional genotypes of HEV[J]. *J Med Virol*, 1999, 57: 243 - 251.
- [15] Schlauder G G, Frider B, Sookoian S, et al. Identification of 2 novel isolates of hepatitis E virus in Argentina[J]. *J Infect Dis*, 2000, 182: 294 - 297.
- [16] Worm H C, Schlauder G G, Wurzer H, et al. Identification of a novel variant of hepatitis E in Austria: sequence, phylogenetic and serological analysis[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81: 2885 - 2890.
- [17] Erker J C, Desai S M, Mushahwar I K. Rapid detection of hepatitis E virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reac-

- tion using universal oligonucleotide primers[J]. *J Virol Methods*, 1999, 81: 109 - 113.
- [18] van der Poel W H M, Verschoor F, van der Heide R, et al. Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, the Netherlands[J]. *Emerg Infect Dis*, 2001, 7(6): 970 - 976.
- [19] Wang Y C, Levine D F, Bendall R P, et al. Partial sequence analysis of indigenous hepatitis E virus isolated in the United Kingdom [J]. *J Med Virol*, 2001, 65: 706 - 709.
- [20] Zanetti A R, Schlauder G G, Roman Ó L, et al. Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy[J]. *J Med Virol*, 1999, 57: 356 - 360.
- [21] 葛胜祥, 张军, 彭耿, 等. 基于多聚化重组抗原的戊型肝炎病毒抗体 IgM、IgG ELISA 方法的建立和初步应用[J]. *病毒学报*, 2003, 19: 74 - 82.
- [22] Schlauder G G, Mushahwar I K. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus[J]. *J Med Virol*, 2001, 65: 282 - 292.
- [23] Buisson Y, Grandadam M, Nicand E, et al. Identification of a novel hepatitis E virus in Nigeria[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81: 903 - 909.
- [24] Maila H T, Bowyer S M, Swanepoel R. Identification of a new strain of hepatitis E virus from an outbreak in Namibia in 1995 [J]. *J Gen Virol*, 2004, 85: 89 - 95.
- [25] Pina S, Buti M, Cotrina M, et al. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain[J]. *J Hepatol*, 2000, 33: 826 - 833.
- [26] Schlauder G G, Dawson G, Erker J C, et al. The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in United States[J]. *J Gen Virol*, 1998, 79: 447 - 456.
- [27] Hsieh S Y, Yang P Y, Ho Y P, et al. Identification of a novel strain of hepatitis E virus responsible for acute hepatitis in Taiwan [J]. *J Med Virol*, 1998, 55: 300 - 304.
- [28] 蓝海云, 王佑春, 李卓, 等. 戊型肝炎病毒 I 型在 300 例急性肝炎中的感染比例[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2002, 22(3): 276 - 278.
- [29] 郑玲, 柳丽娟, 胡莹盈, 等. 抗 HEV 衣壳蛋白重组抗原 E2-IgM 是诊断急性戊型肝炎的敏感和特异的血清学指标[C]. *全国肝病实验室诊断与临床研究专题学术会议论文集*, 北海, 2004. 51 - 53.

Design and Preliminary Application of a Set of Highly Sensitive Universal RT-PCR Primers for Detecting Genotype I/IV Hepatitis E Virus

GE Sheng-xiang, GUO Qing-shun, LI Shao-wei, ZHANG Jun, XIA Ning-shao

(Research Center for Medical Molecular Virology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Genomic sequences of genotypes I, II, III and IV of hepatitis E virus were aligned and the conserved region was selected for designing a set of reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) primers, which were denominated as E primers. The sensitivity of E primers and three sets of reported primers (Meng, ConORF1 and ConORF2) were compared by using HEV genotypes I and IV challenged monkeys stools and sera of hepatitis E patients. The detection limit of E primers for genotype I HEV in monkey stools was 10 to 1000 times lower than that of reference primers, and the same or 10 times lower than that of reference primers for genotype IV HEV. When amplified by RT-PCR using E primers, five out of seventeen (29.4%) anti-HEV IgM positive patients sera were positive, and just 1 or 2 samples were positive when RT-PCR were performed using reference primers. Thus, the E primers would be a better choice for detection of HEV RNA in samples from China, where only genotype IV and genotype I HEV were reported.

Key words: hepatitis E virus; Genotype I; Genotype IV; polymerase chain reaction; universal primer

Corresponding author: XIA Ning-shao, E-mail: nsxia@jingxian.xmu.edu.cn