维普资讯 http://www.cqvip.com

61-64

第8卷第1期
1993年3月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

Vol.8 No.1
Mar. 1993

用PAP法对流行性乙型脑炎急性期患者外周血白细胞中的乙脑病毒相关抗原定位检测

龚瑛 吴元龙 冯仙珍 肖永久

(10)

(武汉市传染病医院，武汉430022)

R512.32
R446.62

提 要

1991年7—8月在流行性乙型脑炎收治中，用PAP法对急性期患者外周血白细胞进行乙脑病毒相关抗原检测。结果：总检出率为41.2%(24/51)，各型检出率：轻型25.0%(2/8)、通普型44.8%(13/29)、重型42.9%(6/14)，三型间检出率无差异($p<0.05$)。检出病程最早3天，最迟10天。三种白细胞检出率依次为：中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞，可在三种或二种细胞中同时检出，亦有仅见于一种细胞之中。并就检出意义进行了讨论。

关键词：流行性乙型脑炎（乙脑） 乙脑病毒相关抗原（JEV-AAg） 过氧化物酶抗过氧化物酶法（PAP法） 检测 急性期 外周血白细胞

1991年在收治流行性乙型脑炎（以下简称乙脑）中，用过氧化物酶抗过氧化物酶法（PAP法）对乙脑急期患者51例的外周血白细胞进行了乙脑病毒相关抗原的定位检测，结果报告如下：

诊断与检测

1. 病例的诊断依据 1. 乙脑流行季节7—8月份收治病例。2. 具有乙脑临床症状和体征以及CSF改变。3. 临床分型：按《传染病学》[1]进行，入院病型：轻型8例，普通型29例，重型14例。男30例，女21例。年龄5岁内32例，6—10岁16例，11岁以上3例，最小1岁，最大13岁，入院病程最短2天，最长10天。4. 特异性诊断：用美国CDC乙脑试剂MAC-ELISA法检测血清和CSF中IgM抗体，检出阳性率88.2%(45/51)，其中：双阳性，58.8%(30/51)，血清阳性19.6%(10/51)，CSF阳性9.8%(5/51)，两项阴性5例及CSF阴性1例占11.8%(6/51)。

2. 检测试剂与方法

（1）试剂：①免抗乙脑高价血清：由军事医学科学院五所李钟铎教授提供。2. PAP试剂：由同济医学院临床免疫研究室提供。

（2）检测方法：患者入院后即采肝素抗凝血2ml，按常规法分离白细胞制片，冷丙酮固定后

本文于1992年6月3日收到，9月1日修回。

维普资讯 http://www.cqvip.com

存冰箱集中备检。检测时：①将细胞片浸入pH7.4PBS液5分钟，待干。②0.3%H_2O_2阻断内源性过氧化物酶。③加兔抗乙脑血清，37℃温箱30分钟后置4℃冰箱24小时。④加入最适浓度的羊抗兔抗体，37℃30分钟。⑤加入适量的PAP37℃30分钟。⑥加DAB染色10分钟，流水冲洗；用苏木素复染，乙醇脱水，浸入二甲苯液2次后封片镜检。上列2—4步均用PBS液洗3次。结果判断：显微镜下可见细胞浆内有棕褐色颗粒者，即JEV-AAg阳性细胞。

另取10名供血员和8例伤寒、菌痢、流行性腮腺炎患者抗凝全血分离白细胞作对照检测，结果均为阴性。

结 果

总检出率为41.2%（21/51），各病型检出率：轻型25.%（2/8）、普通型44.8%（13/29）重型42.9%（6/14），三型间经统计学处理无明显差异（（p>0.05）。见附表。

表. 用PAP法对急性期乙脑患者血液白细胞JEV-AAg定位检测

Tab. The detection of JEV-AAg in the peripheral blood leucocyte on patients with acute epidemic encephalitis

病期(天) (days)		1～2		3～4		5～5	
检测例数 cases		受检数 No. of case	阳性数 Positive	受性数 No. of case	阳性数 Positive	受检数 No. of case	阳性数 Positive
病型 Type	轻型 mild			5	1	3	1
	普通型 Common	2	0	16	7	8	5
	重型 Severe			6	3	6	1
合计 Total		2	0	27	11	17	7
各病期检出率 Deteced rate(%)		0		40.7		41.2	

病期（天） (days)		7～8		10		
检测例数 cases		受检数 No. of case	阳性数 Positive	受检数 No. of case	阳性数 Positive	各病型检出率 Detected rate (%)
病型 Type	轻型 mild					25.0(2/8)
	普通型 Common	3	1			44.8(13/29)
	重型 Severe	1	1	1	1	42.8(6/14)
计合 Total		4	2	1	1	42.2(21/51)
各病期检出率 Deteced rate(%)		50.0		1/1		

维普资讯 http://www.cqvip.com

阳性细胞分布模式：21例阳性者中三种白细胞共检出39例次（中性粒细胞19次，单核细胞11次，淋巴细胞9次）。分布模式：三种白细胞均阳性者占33.3%（7/21）。中性、单核和中性、淋巴细胞阳性者各2例（各占9.5%），中性（+）8例，单核（+）2例共占47.6%。

讨　论

有关乙脑病毒抗原定位检测，施逢文用PAP法在鼠脑JEV实验感染研究中，获得较好效果[2]。吴霞等在乙脑尸检脑组织研究中，作四种免疫组化染色对比检查，认为PAP法敏感性最好，30年前标本中均可检出[3]。李志尚等亦有相关报告[4]。本院曾用IFA法观察急性期乙脑外周血白细胞JEV-AAg定位检查，1986年混合细胞检出率38.0%（19/50），1987年在三种白细胞中检出率41.6%(10/24)[5]。本次检测用PAP法，结果与上两次相似，检出率为41.2%（21/51），三种白细胞中均有检出。PAP法方法简便，定位显色清楚，易于保存，可做动态检测的参考。

JEV-AAg定位检测的意义，我们初步认为是：1. 乙脑病毒扩散方式和发病机理：目前多数学者认为乙脑发病机理是：蚊叮咬人后，乙脑病毒侵入人体，先在单核—巨噬细胞内繁殖，继而进入血液循环引起病毒血症，当机体防御机能减弱，病毒量多或毒力强时，可经血脑屏障进入中枢神经系统而致脑炎[1,6]。我们在3次用两法(IFA、PAP)均在急性期患者外周血白细胞中检出JEV-AAg，阳性率约40%左右，时间长达7—10天，在单核、中性、淋巴细胞中均可检出；并于1987、1991年在少数病人CSF细胞中亦检出JEV-AAg，证实上述发病机理，既有细胞内乙脑病毒的病毒血症存在，也有载有病毒细胞进入血脑屏障的依据。2. JEV-AAg阳性细胞中JEV存在形式问题：因这三种白细胞均具有免疫活性，在病程7天后仍能检出抗原，不能排降解产物的可能性，此前至少可认为是病毒携带状态。80年代以来，有的病毒性疾病先在白细胞中检出相关抗原，且分离出病毒，如李法卿等对EHF的研究已予证实[7,8]。乙脑患者外周血JEV-AAg阳性白细胞作JEV分离，值得进一步研究。3. 有辅助诊断意义，可作为血清学诊断的补充。4. 如作动态观察变化，评价抗病毒药物的疗效，亦可探索。

参考文献

〔1〕 彭文伟主编，1990，传染病学（第三版）p34，37，人民卫生出版社。
〔2〕 施逢文，1985，中华病理学杂志，14(3)：233
〔3〕 吴霞等，1986，上海免疫学杂志，6(5)：275。
〔4〕 李志尚等，1989，中华病毒学杂志，18(2)：148。
〔5〕 龚瑛等，1988，等3次全国传染病与寄生虫病学术会议论文摘要汇编（沈阳）p27。
〔6〕 翁心植主编，1991，内科学辞典，p2，北京科技出版社。
〔7〕 李法卿等，1983，江苏医药，9(11)：10。
〔8〕 李法卿等，1985，江苏医药，11(10)：23。

维普资讯 http://www.cqvip.com

Application of PAP Method Detecting on JEV-Associated Antigen in the Peripheral Blood Leucocyte on Patients with Acute Epidmeic B Encephalitis

Gong Ying et al

(Wuhan Infectious Diseases Hospital, Wuhan 430022)

The Epidemic B Encephalitis Viral Associated Antigen (JEV-AAg) in the peripheral blood leucoyte were detected with PAP method in the patients with acute Epidemic B Encephalitis during July to August 1991. Results: The total positive rate of JEV-AAg in leucocyte was 41.2%(21/51). The positive rate and the type of the disease were compared, 25% (2/8) in the mild type, 44.8% (13/29) in the ordinary type and 42.9% (6/14) in the severity type, there was on significant difference between the two types. The JEV-AAg can be detected in the neutrocyte, monocyte and lymphocyte, or all three cells, or two cells, or only one. The positive series was 3—10 days after the onset. The detected results were evaluated in signification.

Key words: Epidemic B Encephalitis JEV-associated antigen Peroxidase anti-peroxidase method (PAP method)