

应用固相放射免疫分析法测定流脑患者的C-反应性蛋白水平

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所

陈贤辉 李之桂 王长鳌 于永茂 刘玉兰 巩志叶

提要 本文报道应用竞争性固相放射免疫分析法测定流脑患者血清和CSF中CRP的水平。发现流脑患者血清CRP含量约为健康人的400~500倍；其急性期血清CRP水平(28.5~540μg/ml, 中位数200μg/ml)比恢复期(0.1~54μg/ml, 中位数0.53μg/ml)高出300~400倍。从CSF中也能检测到较低水平(0.07~150μg/ml, 中位数2.07μg/ml)的CRP。结果充分显示CRP作为急性相反应物质的特征。因此, CRP水平的测定, 可为细菌性和非细菌性脑膜炎的鉴别诊断和疾病过程的监测, 提供重要的辅助指标。

关键词 C-反应性蛋白 流行性脑脊髓膜炎 固相放射免疫分析法

C-反应性蛋白(C-reactive protein, CRP)是机体一种重要的急性相反应物质。正常人体血清中CRP的含量甚微, 在感染、组织损伤和恶性肿瘤等病理条件下, 其含量可急剧增高, 当病理状态消除之后, CRP又可迅速降至正常水平^[1~4]。因此, CRP水平的测定, 可以作为某些疾病的鉴别诊断、疾病过程的监测以及疗效判定的重要非特异性指标。由于细菌性脑膜炎时的血清CRP水平远高于病毒性脑膜炎或脑炎, 因此, CRP含量的测定, 对于鉴别儿童中枢神经系统感染类型方面, 也有重要的意义^[8~10]。为进一步了解流脑发病过程中的急性相应答现象及其意义, 我们应用固相放射免疫分析法^[13], 对正常人血清及流脑患者的血清和脑脊液中的CRP水平进行测定, 结果报道如下。

材料与方 法

一、标本来源

1. 正常人血清: 血库献血员的血清。
2. 流脑患者血清及脑脊液: 为临床诊断为流脑患者的血清和脑脊液。其中包括整个病程只采血一次者(不分期血清)和急性期、恢复

期分别采血者(分期血清)。

二、材料:

1. CRP抗原及抗CRP抗体, 按文献介绍的方法制备^[5,12,13]。
2. CRP标准品: 0.5 mg/150μl (Sigma)。
3. ¹²⁵I-CRP的制备: 基本按Greenwood等介绍的氯胺-T法进行碘化标记^[14,15]。放化纯度为96~99%; 比放射性为27~43μci/μg。
4. 固相材料: 聚氯乙烯(PVC)软性微量滴定板(20~96孔), 天津有机玻璃制品厂产品。

三、微量固相放射免疫分析法程序: 参照Catt等介绍的抗体包被竞争性固相放射免疫分析法稍加改进^[11,13]。主要步骤包括①抗体包被: 每孔加入1:1000的抗CRP100μl, 4℃温育18~20小时, 用含有吐温-20的PBS(PBST)洗孔4次。②竞争抑制结合反应: 每孔加入CRP标准品(或待检标本)50μl、¹²⁵I-CRP 50μl(5~6万CP30S), 同法温育和洗孔。最后依次剪下小孔, 装入塑料管内, 用γ-免疫计数器(FJ-2003)进行放射性计数。

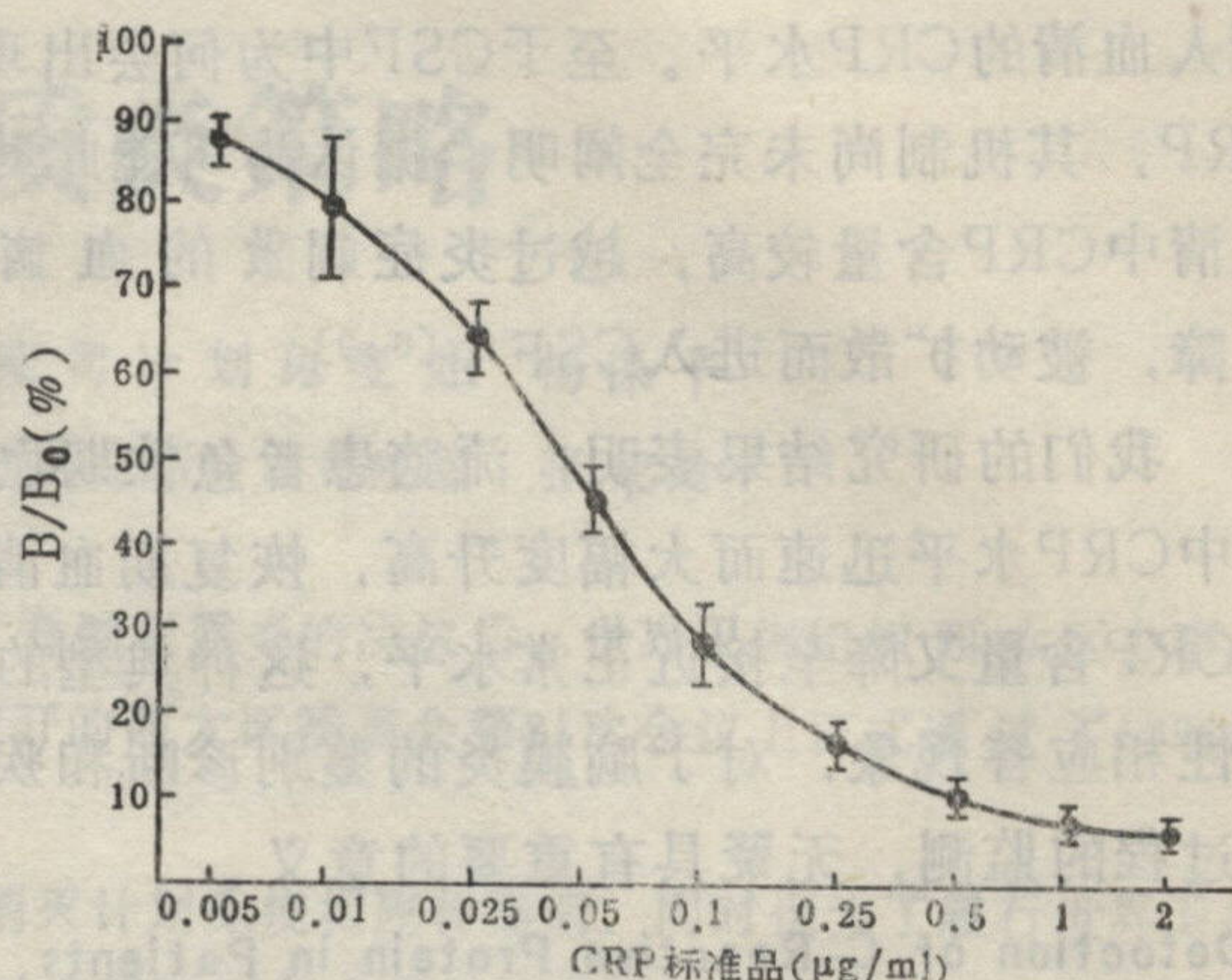
四、数据处理及结果的计算: 以不同剂量

的CRP标准孔的双孔平均计数 (CP30S) 为B, 零标准孔 (不含标准CRP) 的平均计数为B₀, 得到一系列的B/B₀%结合率, 以此为纵座标。以不同剂量的CRP标准为横座标, 在半对数座标纸上绘制出剂量-反应曲线。在同样的实验条件下, 根据待检标本的结合率, 从标准曲线上查知其CRP含量, 乘以稀释倍数即为该标本的CRP浓度, 以μg/ml表示。

实验结果

一、标准曲线及方法的灵敏度: 同批制作8条标准曲线, 其结合率的均值和标准差如图 所示。平均最高结合率 (B₀/T%) = 28.46 ± 1.76, CV=6%; ED₅₀=42ng ± 6.1, CV= 14.6%。计算上述8条标准曲线的16个B₀孔的 平均结合率, 按“零标准法”计算, 区别于

B₀-2SD的最小可测量为5ng/ml (0.25ng/ 孔)。



附图 CRP固相RIA的标准曲线 (n=8)

二、各组标本的CRP含量测定结果: 见附 表。

附表

正常人和流脑患者CRP测定结果

标本名称	例数	CRP含量 (μg/ml)	中值 (μg/ml)	均值 (μg/ml)
健康成人血清	68	0.025~3.400	0.166	1.570
流脑患者不分期血清	63	0.150~520.000	77.500	88.460
急性期血清	12	28.500~540.000	200.000	200.600
恢复期血清	16	0.100~54.000	0.530	4.190
CSF	35	0.070~150.000	2.070	7.600

讨 论

正常人体血液或其他体液中CRP含量很 低, 只有采用高灵敏度的检测方法方能证实其 存在^[1,4,7]。血清中的CRP一般为1~2μg/ ml, 如高于10μg/ml以上, 常提示存在某些病 理过程。在细菌性感染时, 血清CRP水平比正 常人高出数百倍以上^[1,8]。我们测定68份健康 人血清, CRP在0.028~3.4μg/ml之间, 中位 数0.166μg/ml。这同Class等用传统液相放免 测定的结果基本一致^[7]。

Peltola曾报道用散射浊度测定法检测细 菌性脑膜炎和病毒性脑膜炎患者血清CRP水平, 结果表明, 16例细菌性脑膜炎患者血清CRP含 量平均为217μg/ml, 其中两例脑膜炎双球菌所

致的患者, 分别为81和400μg/ml。而15例病 毒性脑膜炎患者, 只有1例的CRP含量略高于 正常人, 因而认为CRP水平的测定, 可以鉴别 细菌性和病毒性脑膜炎。我们测定63例流脑患 者的血清, 其CRP在0.15~520μg/ml之间, 中位数77.5μg/ml, 比健康人高出数百倍。住 院后有两次采血的患者, 其急性期血清CRP水 平显著升高, 范围在28.5~540μg/ml之间, 中 位数200μg/ml, 而恢复期血清的CRP几乎降 至正常水平, 中位数为0.53μg/ml。此种结 果, 充分显示CRP在流脑发病过程中的急性相 反应物质的特征。

细菌性脑膜炎患者的CSF中常有较低水平 的CRP存在, 而病毒性脑膜炎则很少能检测 到, 据此也可作为鉴别细菌性与非细菌性脑膜

炎或脑炎的重要辅助指标^[8~10]。我们测定35份流脑患者CSF中的CRP,其含量在0.07~150μg/ml之间,中位数2.07μg/ml,略高于健康人血清的CRP水平。至于CSF中为何会出现CRP,其机制尚未完全阐明。据认为可能此时血清中CRP含量较高,越过炎症刺激的血脑屏障,被动扩散而进入CSF中^[6,9]。

我们的研究结果表明,流脑患者急性期血清中CRP水平迅速而大幅度升高,恢复期血清的CRP含量又降至接近正常水平,这种典型的急性相应答现象,对于脑膜炎的鉴别诊断和疾病过程的监测,无疑具有重要的意义。

Detection of C-Reactive Protein in Patients with Epidemic Cerebrospinal Meningitis by Solid Phase Radioimmunoassay Chen Xianhui, et al., Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing

A modified solid phase RIA was developed for the quantification of C-reactive protein in human serum and CSF. The lowest measurable amount detected by this method was 5 ng/ml (0.25ng/well). The serum levels in 68 healthy blood donors were within the range from 0.028~3.4μg/ml, with a median value of 0.166μg/ml (mean=1.57μg/ml); whilst those in 63 patients with epidemic cerebrospinal meningitis were up to 520μg/ml with a median value of 77.5μg/ml (mean=88.46μg/ml). This is 400~500-fold higher than that of the normal. The levels of CRP in the sera collected during acute stage of the infection (ranged from 28.5~540μg/ml, with a median value of 200μg/ml, mean=200.6μg/ml) were 400-fold higher than that after recovery (ranged from 0.1~54μg/ml, with a median value of 0.53μg/ml). In addition, lower levels (0.07~150μg/ml, median=2.07μg/ml) of CRP were detected in CSF. These results markedly revealed that the CRP reflected the characteristics of an acute phase protein in the infection, and would be useful for the differential diagnosis of bacterial and nonbacterial meningitis, and in monitoring the clinical course of the illness.

Key words C-reactive protein Epidemic

cerebrospinal meningitis Solid phase RIA

参 考 文 献

1. Pepys MB, et al. Acute phase protein with special reference to C-reactive protein and related protein (Pentaxins) and serum amyloid A protein. In: Dixon J, et al. eds. Advance in immunology, 1983: 141.
2. Gewurz D. Biologic reactivities and functions of CRP. J Lab Clin Med 1981; 97: 747.
3. Kushner I, et al. C-reactive protein and the acute-phase response. J Lab Clin Med 1981; 97: 739.
4. 李之桂, 等. 感染症与C反应性蛋白. 免疫诊断. 中华流行病学杂志编辑部, 1984: 52.
5. 曾耀辉, 等. 感染症鉴别诊断用抗C-反应蛋白抗体试剂的研制和应用. 免疫诊断. 中华流行病学杂志编辑部, 1984: 59.
6. Trienekens PH, et al. Significance of C-reactive protein in spinal fluid. 1985; 31(2): 345.
7. Claus DR, et al. RIA of human C-reactive protein and levels in normal sera. J Lab Clin Med 1976; 87: 120.
8. Shine P, et al. Solid phase RIA for human C-reactive protein. Clinica Chimica Acta 1983; 117(1): 12.
9. Corral CJ, et al. C-reactive protein in spinal fluid of children with meningitis. J Pediatrics 1981; 99(3): 365.
10. Peltola HO. CRP for rapid monitoring of infection of the central nervous system. Lancet 1982; 1(8279): 980.
11. Catt K, et al. Solid phase RIA in antibody-coated tubes. Science 1967; 158(3808): 1570.
12. 李之桂, 等. 应用双抗体夹心的ELISA快速法检测流脑病人C-反应性蛋白的研究. 全国流行性脑脊髓膜炎科研防治论文集, 1986: 130.
13. 陈贤辉, 等. C-反应性蛋白的微量固相放射免疫分析及其初步应用(待发表).
14. Greenwood FC, et al. The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem J 1963; 89: 114.
15. Willian DO, et al. Radioidination of peptides and proteins for RIA or radioreceptor assay. In: Rose NR, et al. eds. Manual of Clinical Immunology, 1980: 329.

(1989年11月4日收稿, 1990年4月20日修回)

154月