

뇌척수액누출의 진단을 위한 Immunofixation에 의한 Transferrin 분석

이문희 · 전동석 · 전효진 · 김재룡

계명대학교 의과대학 임상병리학교실

Transferrin Analysis by Immunofixation for The Diagnosis of Cerebrospinal Fluid Leakage

Moon Hee Lee, M.D., Dong Seok Jeon, M.D., Hyo Jin Chun, M.D., and Jae Ryong Kim, M.D.

Department of clinical pathology, College of Medicine, Keimyung University, Taegu, Korea

Background : CSF can be leaked from the nose or ear due to fractures, tumors or surgical procedures in the skull base region, and the threat of impending meningitis necessitates early identification of it. Since β_2 -transferrin occurs practically in cerebrospinal fluid (CSF) and not in other body fluid, its detection from the rhinorrhea or otorrhea can be used for the diagnosis of CSF leakage. We carried out immunofixation-silver stain (IF-SS) method for detection of β_2 -transferrin in the CSF in order to know optimal identification condition of specific cerebrogenic marker.

Methods : The fresh CSF sample was collected by spinal tapping. β_2 -Transferrin was estimated by quantifying the total transferrin by nephelometry (Behring, Germany). β_2 -Transferrin of CSF was identified by electrophoresis using Titan gel high resolution protein system (Beckman, USA), immunofixation with anti-human transferrin antibody (Dako, Denmark) and then stained with silver nitrate. Serial dilutions of CSF were performed to know the detection limit of β_2 -transferrin. To know the influence of blood mixing, tests for mixed specimen of serum and hemolysate in CSF were performed. To evaluate the specimen storage condition, tests for different temperature and storage time were performed.

Results : By IF-SS method, identification limit of β_2 -transferrin was 0.5 mg/dL in 1:4 diluted CSF with distilled water. And β_2 -transferrin could be detected in condition of mixing serum protein (7.5 g/dL) or hemoglobin (13 g/dL) with CSF up to 6 : 4. At various sample storage condition, such as 37°C, room temperature, and 4°C, band intensity decreased abruptly after 1 day, and it was not detected 5 days later. Mean while, in -20°C and -70°C, β_2 -transferrin band was detected after 10 days.

Conclusionss : IF-SS method was sufficiently sensitive and specific for invalidation by blood contamination, and seems to be used as effective identification of β_2 -transferrin in the CSF without sample concentration, less diagnostic test for CSF leakage. (Korean J Clin Pathol 1999; 19: 46-51)

Key words : CSF, β_2 -Transferrin, Immunofixation, Silver stain

서 론

귀 혹은 코로부터 뇌척수액이 누출되는 주된 원인으로는 외상

으로 인한 두개골절, 두개기저부의 수술 혹은 종양 등이 있다. 이러한 뇌척수액누출의 경우는 조기에 진단하고 치료하지 않으면 뇌막염이 발생할 위험이 매우 높다고 알려져 있다[1-5].

뇌척수액누출이 임상력, 이학적 소견, 두부 X-선 촬영 등의 방법으로 진단이 불가능한 경우에는 검사실적 소견에 의존해야 된다. 뇌척수액누출의 확인을 위한 임상병리검사로는 액(液)내의 포도당, 단백질 및 전해질의 농도 등을 분석하는 방법이 있으나 이는 낮은 예민도 및 특이도로 문제가 된다[2-4, 6-11].

접 수 : 1998년 7월 22일

접수번호 : KJCP1193

수정본접수 : 1998년 9월 1일

교신저자 : 전 동 석

우 700-310 대구광역시 중구 동산동 194

계명대학교 동산의료원 임상병리과

전화 : 053-250-7222, Fax : 053-250-7275

뇌척수액내에 존재하는 transferrin은 β_1 과 β_2 의 두 가지 형태로 존재한다. β_1 -transferrin은 혈액에서 유래한 것으로 모든 체액에 공통적으로 존재하나 β_2 -transferrin은 뇌척수액과 방수에 존재하는 것으로 알려져 있으며 특히 전자의 경우는 뇌척수액내에 존재하는 neuraminidase에 의해 β_1 -transferrin이 desialization된 것이다[12]. 따라서 뇌척수액에만 특이하게 존재하는 β_2 -transferrin을 동정함으로써 뇌척수액누출의 진단이 가능하며, β_2 -transferrin의 동정법으로는 면역고정법(immunofixation)[13, 14], isoelectric focusing (IEF)[14, 15] 등의 방법이 있다. 면역고정 후 단백분획은 통상 CBB (Coomassie brilliant blue R-250)염색으로 관찰할 수 있다. 그러나 CBB 염색의 경우 최소한 단백질농도가 30-40 g/L가 되어야 단백질분획의 관찰이 가능하므로 검사를 위해서는 가검물을 50-100배 정도의 농축하여야 하고, 5-7 mL 정도의 많은 양이 필요하므로 소량의 뇌척수액이 누출되는 경우에는 검사가 불가능하다[3, 12, 13, 16].

Willoughby and Lambert[17]에 의하면 단백질염색에 있어서 은염색(silver stain)의 예민도가 매우 높아 전기영동상에서 20-40 ng의 IgG 분획의 관찰도 가능한 것으로 알려졌다. 따라서 transferrin-면역고정 후 은염색법으로서 β_2 -transferrin 분석을 실시하면 미량의 가검물로서도 뇌척수액누출의 진단이 가능할 것으로 사료된다.

이에 본 연구에서는 β_2 -transferrin을 면역고정 후 은염색[16-18]법으로 분석하여 뇌척수액에 대한 검출한계, 검체보관조건 및 혈액의 오염이 검사에 미치는 영향을 조사함으로써 뇌척수액누출의 진단검사로써의 가치를 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

면역고정 후 은염색법의 뇌척수액 검출한계와 보관조건 및 혈액오염이 검사에 미치는 영향을 알아보고자 척추천자하여 얻어진 신선한 뇌척수액 10예를 가검물로 이용하였다. 총 transferrin치는 nephelometry (Behring, 독일)로 측정하였다. β_2 -transferrin의 측정을 위한 면역고정법은 1) 고정도 단백질전기영동(high resolution protein electrophoresis), 2) 면역고정, 3) 은염색 등의 3단계 과정으로 실시하였다. 고정도 단백질전기영동은 Titan gel high resolution protein system (Beckman, 미국)을 사용하였는데 먼저 겔(gel) 판에 4 μ L의 뇌척수액을 도포하여 250 volt에 20분 동안 전기영동시켰다. 14 g/L의 항인 transferrin 항체(anti-human transferrin antibody; Dako, 덴마크)를 1:3으로 희석하여 겔판에 부은 후 아래에는 증류수를 적신 gauze를 깔고 37°C 부란기에 1 시간동안 면역 고정하였다. 그 후 탈단백은 4-5시간 간격으로 생리식염수를 갈아주면서 1-2일정도 실시하였다.

β_2 -Transferrin band의 동정을 위한 은염색 과정은 Mehta and Patrick[15]의 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 탈단백한 겔판을 고정액(증류수 1 μ L당 sulfosalicylic acid 35 g, trichlo-

roacetic acid 50 g, zinc sulfate 50 g을 포함)에 10분간 고정시킨 뒤 1시간동안 흔들어주며 수세하였다. 그 후 15분간 Whatmann No. 3 여과지에 흡착하여 따뜻한 공기에서 말린 후 다시 겔을 5분간 수세하고 건조시켰다. 은염색을 위하여 염색액은 용액 A (증류수 100 mL 당 Na_2CO_3 5 g을 포함)와 용액 B (증류수 200 mL당 ammonium nitrate 0.4 g, silver nitrate 0.4 g, silicotungstic acid 1.0 g, 370 g/L용액의 formaldehyde 2.8 mL을 포함)를 염색 직전에 1:2의 부피 비로 혼합하여 준비한다. 건조된 겔판에 도포하여 3분간 세차게 흔든 후 염색액이 흰색에서 회색으로 변하면 겔판을 증류수에 수세한 후 신선한 염색액으로 재염색하였다. 2-3분 후에 transferrin band가 원하는 강도로 발색되면 1% acetic acid 용액에 15분간 염색반응을 정지시키고 증류수에 5분간 수세하고 건조시켰다. Band의 강도는 육안으로 관찰하여 negative(-), trace($\pm$), positive(+)로 구분하여 판독하였다.

Immunofixation-silver stain법(이하 IF-SS법이라 함)의 β_2 -transferrin에 대한 검출한계를 알아보기 위해 뇌척수액을 1:32까지 배수 희석하여 검사하였으며, 이때 그 절대치는 은염색된 겔판을 densitometry를 이용하여 β_2 -transferrin 분획의 백분율을 구한 다음 총-transferrin치에 곱하여 산출하였다. IF-SS법의 hemoglobin (Hb)에 의한 간접효과를 알아보기 위해 13 g/dL의 용혈물(hemolysate)과 뇌척수액을 9:1, 8:2, 6:4, 4:6 및 2:8비로 각각 혼합하여 검사하였으며, 단백질에 의한 간접효과를 알아보기 위해 7.3 g/dL의 혈청과 뇌척수액을 9:1, 8:2, 6:4 및 2:8비로 혼합하여 검사하였다.

보관온도 및 경과시간에 따른 IF-SS법에 미치는 영향을 알아보기 위해서 뇌척수액을 37°C, 실온, 4°C, -20°C, -70°C에 각각 보관하고 1일, 2일, 3일, 5일, 및 10일이 경과된 후에 검사를 실시하였다.

성적

1. IF-SS법에 의한 뇌척수액의 β_2 -transferrin 검출한계

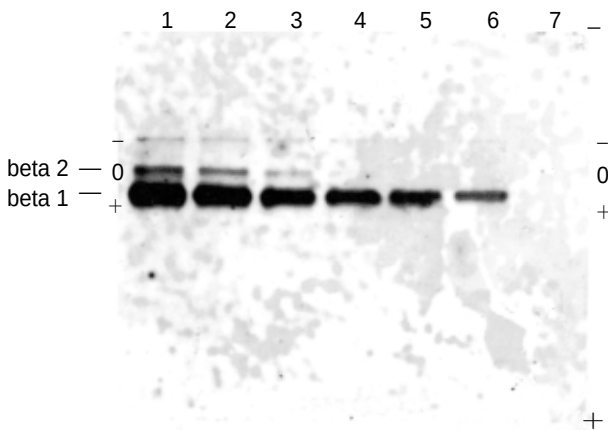
10예의 뇌척수액의 총 transferrin치는 63.5 ± 14.9 mg/dL이었으며, β_2 -transferrin의 분획은 $6.9 \pm 3.7\%$ 로서 그 절대치는 2.4 ± 1.0 mg/dL이었다. IF-SS법에 의한 뇌척수액의 검출한계는 0.5 mg/dL로서, 이때 뇌척수액은 최고 $\times 4$ 희석배수에서 검출이 가능하였다(Table 1, Fig. 1).

2. 혈청단백이 IF-SS법에 미치는 영향

7.5 g/dL의 혈청과 4예의 뇌척수액을 9:1 부터 2:8로 혼합하여 IF-SS법을 시행한 결과 4개의 검체 모두에서 혈청이 6:4이하로 혼합된 경우(6:4~2:8의 범위)에서 β_2 -transferrin을 관찰할

Table 1. Total and β_2 -fraction of transferrin in CSF and its detection limit by IF-SS method

Total (N=10)	β_2 -fraction		Detection limit of IF-SS	
	(%)	Abs. value*	Dil. factor [†]	Abs. value*
63.5 ± 14.9	6.9 ± 3.7 [‡]	2.4 ± 1.0	1:1 ~ 1:4	0.5

* Absolute value (mg/dL), [†]Dilution factor [‡]Mean SDFig. 1. Detection limit of IF-SS method for β_2 -transferrin analysis by serial dilution of CSF. Lane 1 - 1:2 dilution of CSF; lane 2 - 1:4 dilution of CSF; lane 3 - 1:8 dilution of CSF; lane 4 - 1:32 dilution of CSF.Table 2. Effect of protein on IF-SS for the β_2 -transferrin detection (serum protein: 7.5 g/dL)

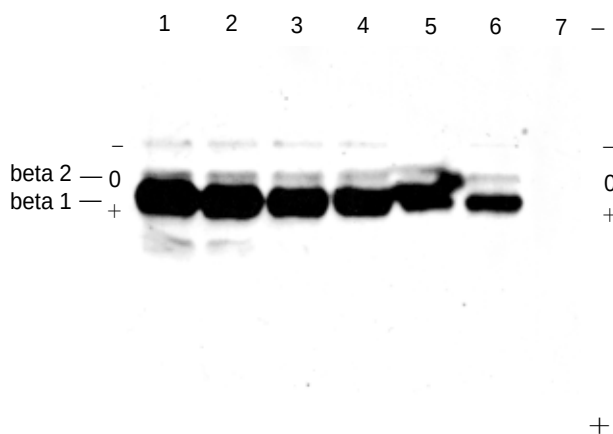
Sample N	Serum : CSF (vol:vol)				
	9:1	8:2	6:4	4:6	2:8
1	-	-	±	+	+
2	+	+	+	+	+
3	-	-	±	+	+
4	-	-	-	±	+

± ~ + means band intensity; negative (-), trace (±), positive (+),

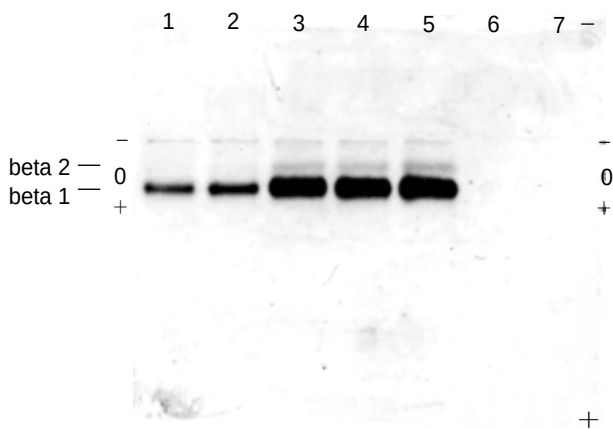
수 있었고, 2번 검체에서는 9:1로 혼합된 경우까지 band를 관찰할 수 있었다(Table 2, Fig. 2).

3. Hb이 IF-SS법에 미치는 영향

13 g/dL의 용혈물로 4예의 뇌척수액을 9:1~2:8로 혼합하여 IF-SS법을 시행한 결과 4개의 검체 모두에서 용혈물이 6:4 이하로 혼합된 경우에서(6:4~2:8의 범위) β_2 -transferrin을 관찰할 수 있었고 2번 검체에서는 8:2로 혼합된 경우까지 약하게 band를 관찰할 수 있었다(Table 3, Fig. 3).

Fig. 2. Interference effect of protein on IF-SS method for β_2 -transferrin analysis. Lane 1 - ×1 serum: CSF; lane 2 - 1:2 diluted serum: CSF; lane 3 - 1:4 diluted serum: CSF; lane 4 - 1:8 diluted serum: CSF; lane 5 - 1:16 diluted serum: CSF; lane 6 - 1:32 diluted serum: CSF.Table 3. Effect of Hb on IF-SS for the β_2 -transferrin detection (Hb: 13 g/dL)

Sample N	Hemolysate : CSF (vol:vol)				
	9:1	8:2	6:4	4:6	2:8
1	-	-	+	+	+
2	-	±	+	+	+
3	-	-	±	+	+
4	-	-	+	+	+

Fig. 3. Interference effect of Hb on IF-SS method for β_2 -transferrin analysis. Lane 1 - volume ratio of hemolysate: CSF = 9:1; lane 2 - volume ratio of hemolysate: CSF = 8:2; lane 3 - volume ratio of hemolysate: CSF = 6:4; lane 4 - volume ratio of hemolysate: CSF = 4:6; lane 5 - volume ratio of hemolysate: CSF = 2:8.

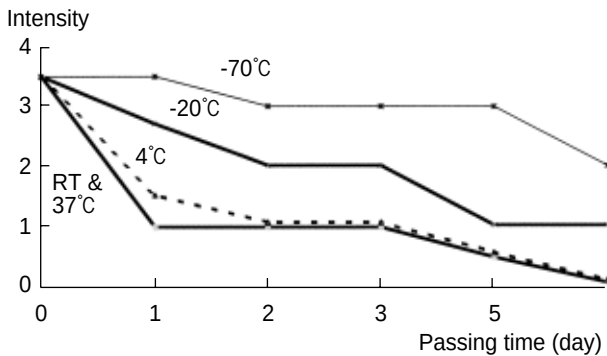


Fig. 4. The effect of storage temperature and passing time on the intensity of β_2 -transferrin band (IF-SS of CSF).

4. 가검물의 보관온도가 IF-SS법에 미치는 영향

37°C, 실온, 4°C에 보관시에는 보관 1일째에 β_2 -transferrin band의 강도가 급격히 감소하였으며 5일째 이후부터는 band의 판독이 곤란하였다. -20°C와 -70°C에서 경과시간에 따라 β_2 -transferrin band의 강도가 다소 감소하는 경향이 있었으나 10 일째 이후에도 β_2 -transferrin band의 강도가 비교적 뚜렷하여 판독에 어려움은 없었다(Fig. 4).

5. 환자 이루어에서의 IF-SS법에 의한 β_2 -transferrin 분석

34세 남자 환자로서 3회에 걸친 발열과 구토를 주소로 내원하였다. 5년전과 8년전에 2회의 뇌막염에 이환된 기왕력이 있었다. 내원 15일전에 발열, 두통, 구토가 다시 재발하여 뇌 자기공명영상(MRI)와 측두골 전산화단층촬영(CT)으로 왼쪽 귀의 만성중이염과 유양동염으로 인한 뇌막염으로 진단받고 항생제치료를 하였다. 이학적 소견상 왼쪽 고실에 이루가 발견되어 IF-SS법을 실시하여 β_2 -transferrin을 검출할 수 있었다(Fig. 5).

고 찰

두부외상이나 뇌수술후 수일내 발생한 뇌척수액누출의 진단은 임상력, 이학적 소견 등으로 추정 가능하나[3] 뇌척수액누출이 지연되는 경우에는 그 진단이 어렵다. 뇌척수액 누출의 진단을 위한 방법으로는 첫째, 방사선학적인 방법으로 수막강내 조영제 주입을 이용한 전산화단층촬영과 자기공명영상[2, 11], 방사활성 뇌조영술(radioactive cisternography)[11, 12] 등이 있으며, 조영제를 이용한 전산화단층촬영은 민감도가 46-81%, 자기공명 영상을 이용한 경우는 80% 정도로 보고되고 있다 그러나 이 방법은 누출의 위치를 정확히 규명할 수 있는 것이 아니며 플루오레신(fluorescein)의 수막강내 주입에 의한 반신마비, 간질 등의 합병

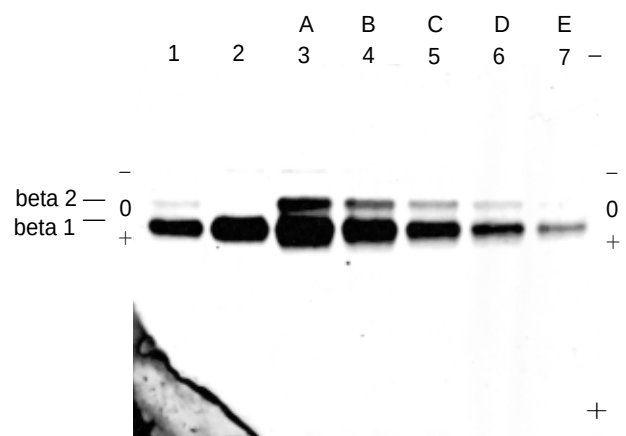


Fig. 5. Electrophoresis with transferrin IF-SS method shows transterrin in otorrhea specimen from patient with recurrent meningitis. Lane 1 - CSF, positive control; lane 2 - serum, negative control; lane 3 - A, otorrhea, original; lane 4 - B, patient otorrhea, 1:2 diluted; lane5 - C, patient otorrhea, 1:4 diluted; lane 6 - D, patient otorrhea, 1:8 diluted; lane7 - E, patient otorrhea, 1:16 diluted.

증의 가능성이 있다. 둘째, 체액의 화학적 분석[6-9]으로 포도당, 단백질, 전해질의 농도를 분석하는 방법은 많은 양의 가검물이 요구되며 그 특이성이 결여되는 단점이 있다.

뇌척수액의 τ -단백질 즉 β_2 -transferrin은 1960년 Pette and Stupp[19]에 의해 neuraminidase로 처리한 후에 β_2 -transferrin에서 τ 쪽으로의 transferrin의 전기영동상 이동의 변화를 관찰함으로써 처음으로 증명되었다. 1965년 Laterne[20]는 β_1 -transferrin이 혈청으로부터 유래된 반면, β_2 -transferrin은 뇌척수액에 존재하는 neuraminidase 활성화에 의해 β_1 -transferrin에서 유래된 것으로서 혈청이나 기타의 체액에는 존재하지 않는 뇌척수액에 특이한 단백임을 밝혀내었다.

Tripathi 등[21]은 sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 및 IEF으로 β_2 -transferrin을 분석한 결과 뇌척수액뿐만 아니라 방수(aqueous humor)에서도 이 band를 동정할 수 있다고 하였다. 이러한 β_2 -transferrin을 동정하는 방법으로 면역화학적 방법[5, 13, 16, 22-24]인 면역고정법이 있는데 이 방법은 분석에 필요한 가검물을 코나 귀로부터 직접 채취하여 검사할 수 있어서 환자에게 비교적 안전한 것으로 평가되고 있으며, 귀나 코의 분비물로 오염되어도 검사에 영향을 미치지 않는 장점이 있다.

뇌척수액내 β_2 -transferrin을 동정하는 방법으로는 현재 면역고정법과 IEF 방법이 이용되고 있다[13-15]. Rolandase등[14]이 면역고정법과 IEF 방법을 비교연구한 결과를 살펴보면, 뇌척수액 유출이 의심되는 43례의 임상 검체에서, β_2 -transferrin이 동정된 17검체중 6검체에서 IEF 방법에서만 동정되었고, 다른 체액과 혼합된 경우, IEF 방법이 2%, 면역고정법이 10%의 CSF 검출한계를 보임으로써 IEF 방법이 면역고정법보다 민감도가 더

예민하다고 보고하였다. 그러나, 저자들은 위의 두가지 방법에 대한 임상적 연관성에 대한 비교는 더 많은 연구가 필요하다고 하였다. 본 실험에서 이용한 면역고정법은 민감도는 IEF 방법에 비해 떨어지지만[14] 비교적 소량의 검체(4 μ L)로도 분석이 가능하고, Ampholione Plate등을 사용해야하는 IEF 방법[13, 14]에 비해 비교적 간단한 장비와 조작방법으로 β_2 -transferrin을 동정할 수 있었다. 결과의 해석도 sharp한 단일 β_2 -transferrin band가 나타나 판독이 용이하였다. 최근 탈단백에 1-2일 소요되는 시간을 단축시키기 위해 임상 검체 7례를 대상으로 흔들어 주면서 생리식염수로 2-4시간 수세하는 방법과 1-2일간 탈단백 시키는 방법을 비교하여 같은 결과를 보여 줌으로써 앞으로 임상에 당일 신속한 결과를 보고할 수 있을 것으로 기대된다.

면역고정후 단백분획을 관찰하기 위한 염색의 방법으로 CBB 염색, 은염색 등의 방법이 있다. CBB염색의 경우 5-7 mL 정도의 많은 양의 가검물이 필요하며, 단백질 농도가 30-40 g/L가 되도록 뇌척수액을 50-100 배 농축해서 도포해야 되는 단점이 있다[3, 13, 16]. 따라서 이 방법은 가검물의 양이 소량일 경우 문제가 된다. 이에 본 연구에서는 은염색법으로 농축하지 않은 소량의 가검물로서 β_2 -transferrin을 동정하고 또한 뇌척수액에 대한 검출한계, 검체보관조건 및 혈액의 오염이 검사에 미치는 영향을 조사함으로써 뇌척수액 누출의 진단검사로서의 가치를 평가하고자 하였다.

Mehta and Patrick[15]에 의하면 CSF를 40배 농축한 뒤에 CBB로 염색한 경우와 농축하지 않고 은염색한 경우에서 비슷한 결과를 나타낸다고 하였다. 은염색의 감도에 대해 Willoughby and Lambert[17]는 IgG의 경우 20-40 ng/band (3-6 ng of IgG/mm of gel)까지 동정할 수 있다고 하였다. 또한, Oberascher[5]는 1 μ L의 순수한 뇌척수액으로도 β_2 transferrin을 동정할 수 있다고 하였다. 비루 혹은 이루에 의해 뇌척수액이 혼입될 경우에는 1 mL의 분비물에서 100 μ L의 뇌척수액이 있으면 감지할 수 있다고 하였다. 본 연구에서는 면역고정후 은염색을 하였을 때 0.5 mg/dL 검출한계를 보였고, 4검체 모두에서 혈청이 6:4 이하로 혼합된 경우, 특히 2번 검체의 경우는 혈청이 9:1로 혼합된 경우에도 β_2 -transferrin을 동정할 수 있어 위의 실험 결과와 비슷한 검출한계를 보였다.

Rouah 등[16]에 의하면 β_2 -transferrin의 동정에 있어서 면역고정 후 CBB염색을 위해서는 가검물을 농축하여야 하나, 가검물이 충분치 못한 경우에는 전기영동시 가검물을 10-20회 중복 도포하여 검사할 수 있다고 하였는데 이 경우에는 β_2 -transferrin band가 흐려지는 단점이 있다. Meurman 등[3]과 Irijala 등[13]에 의하면 β_1 부위에 위치하는 유전적인 이중 transferrin (genetic double transferrin)이 τ -단백질로 오인될 수 있다고 하였다. 따라서 뇌척수액누출을 위한 임상검사로써 IF-SS법을 실시할 경우에는 이점을 고려하여 환자혈청을 음성대조로 사용하는 것이 바람직하다고 생각된다.

본 연구에서 혈청단백의 오염이 IF-SS법에 미치는 영향을 보고

자 일정한 농도(7.5 g/dL)의 혈청을 사용하였는데 이는 혈청단백이 미치는 영향을 표준화시키기 위함이었고 본 연구의 대상이었던 10예의 뇌척수액에서 모두 유전적인 이중 transferrin band는 관찰할 수 없었다.

가검물 보관온도의 변화가 IF-SS법에 미치는 영향에서 37°C, 실온, 4°C에 보관 시에는 보관 1일째에 β_2 -transferrin band의 강도가 급격히 감소하였으며 5일째 이후부터는 band의 판독이 곤란하였다. -20°C와 -70°C에서 경과시간에 따라 β_2 -transferrin band의 강도가 다소 감소하는 경향이 있었으나 10일째 이후에도 β_2 -transferrin band의 강도가 비교적 뚜렷하여 판독에 어려움은 없었다(Fig. 4). 따라서 본 실험에 적용되는 가검물은 -20°C와 -70°C에서 보관되거나 신선한 가검물일 때 더 정확한 정보를 줄 수 있을 것으로 사료된다. Oberascher[5]는 IF-SS법의 단점으로 겔판의 배경이 과도하게 염색되어 β_2 -transferrin band의 관찰이 곤란한 경우가 있다고 지적하였으나 본 연구에서는 이러한 현상을 관찰할 수 없었다.

이상의 결과로서 IF-SS법은 4 μ L의 소량의 뇌척수액으로써 뇌척수액에만 특이한 β_2 -transferrin을 0.5 mg/dL까지 동정할 수 있었으며 Hb과 단백질에 의한 간섭효과는 비교적 적은 것으로 생각되고, 이상 검체에 적용할 경우 그 검체는 -20°C 이하에 보관하고 신선할 때 더 정확한 정보를 줄 수 있을 것으로 사료된다. 아울러 향후, 기저부의 두개골절이 의심되면서 소량의 이루나 비루가 있는 환자에 실질적으로 적용될 수 있는 검사법으로 사료된다.

요 약

배경 : 두개골 골절, 종양, 외과적 치료에 기인한 뇌척수액의 유출은 뇌수막염을 유발할 위험성이 많아 초기에 진단하는 것이 임상적으로 매우 중요하다. β_2 -transferrin은 다른 체액에는 존재하지 않고 주로 뇌척수액에 존재하므로, 이루나 비루에서 뇌척수액 유출을 진단하는데 사용될 수 있다. 이에 본 연구에서는 면역고정 후 β_2 -transferrin을 은염색(silver stain)하여 뇌척수액누출을 검출하고자 하였으며 아울러 검체보관조건 및 혈액의 오염이 검사에 미치는 영향 등 검체의 적정 조건을 알아보려 하였다

방법 : 검체는 척추천자하여 얻어진 신선한 뇌척수액을 대상으로 하였으며, 총 transferrin치는 nephelometry (Berhing, 독일)로 측정하였다. β_2 -transferrin의 측정은 high resolution protein kit (Beckman사, 미국)을 이용하여 뇌척수액을 전기영동한 후 항인 transferrin으로 면역고정하고 은염색하였다. 이 방법의 β_2 -transferrin 검출한계를 알아보기 위하여 뇌척수액을 계단희석하여 검사하였다. 혈액의 오염이 IF-SS법에 미치는 영향을 알아보기 위하여 뇌척수액에 용혈물(hemolysate)과 혈청을 일정한 부피 비로 혼합하여 검사하였으며, 검체 보관조건에 따른 영향을 보기 위하여 온도 및 보관시간을 다르게 하여 검사하였다.

결과 : 뇌척수액에서의 β_2 -transferrin의 동정한계는 0.5 mg/dL

였고 이때 뇌척수액의 희석배수는 1:4 정도였다. 혈청 단백 (7.5 g/dL)과 Hb (13 g/dL)이 6:4 이하로 혼합된 경우에서 β_2 -transferrin을 관찰할 수 있었다. 37°C, 실온, 4°C에 보관시에는 보관 1일째에 β_2 -transferrin band의 강도가 급격히 감소하였으며 5일째 이후부터는 band의 관독이 곤란하였다. 반면에 -20°C와 -70°C에서는 10일째 이후에도 β_2 -transferrin band의 반응강도가 비교적 뚜렷하여 관독에 어려움은 없었다

결론 : IF-SS법은 뇌척수액에 존재하는 β_2 -transferrin에 특이적인 반응을 보였고 검체를 농축하지 않고 미량의 뇌척수액에서도 양성반응을 보였으며 혈액의 오염이 검사에 미치는 영향이 적어서 뇌척수액누출의 진단에 유용할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Briant TD and Snell D. *Diagnosis of cerebrospinal rhinorrhea and the rhinologic approach to its repair. Laryngoscope* 1967; 77: 1390-409.
- Duckert LG and Mathog RH. *Diagnosis in persistent cerebrospinal fluid fistulas. Laryngoscope* 1977; 87: 18-25.
- Meurman OH, Irjala K, Suonpaa J, Laurent B. *A new method for the identification of cerebrospinal fluid leakage. Acta Otolaryngol(Stockh)* 1979; 87: 366-9.
- Neely JG, Neblett CR, Rose JE. *Diagnosis and treatment of spontaneous cerebrospinal fluid otorrhea. Laryngoscope* 1982; 92: 609-12.
- Oberascher G. *A modern concept of cerebrospinal fluid diagnosis in otitis and rhinorrhea. Rhinology.* 1988; 26: 89-103.
- Kirsch AP. *Diagnosis of cerebrospinal fluid rhinorrhea: lack of specificity of the glucose oxidase test tape. J Pediatr* 1967; 71: 718-9.
- Healy CE. *Significance of a positive reaction for glucose in rhinorrhea. Clin Pediatr* 1969; 8: 239.
- Kosoy J, Trieff NM, Winkelmann P, Bailey-BJ. *Glucose in nasal secretions Diagnostic significance. Arch Otolaryngol* 1972; 95: 225-9.
- Hull HF and Morrow G. *Glucorrhea revisited. Prolonged promulgation of another plastic pearl. JAMA.* 1975; 234: 1052-3.
- Henry RC and Tylor PH. *Cerebrospinal fluid otorrhea and otorhinorrhea following closed head injury. J Laryngol Otol* 1978; 92: 743-56.
- Lantz EJ, Forbes GS, Brown ML, Laws-ER, Jr. *Radiology of cerebrospinal fluid rhinorrhea. Am J Roentgenol* 1980; 135: 1023-30.
- Verheeecke P. *On the T-protein in cerebrospinal fluid. J Neurol Sci* 1975; 26: 277-81.
- Irjala K, Suonpaa J, Laurent B. *Identification of CSF leakage by immunofixation. Arch Otolaryngol* 1979; 105: 447-8.
- Rolandase FW, van der Zwart N, Didden JH, van Loon J, Souverijn JH. *Detection of CSF leakage by isoelectric focusing on polyacrylamide gel, direct immunofixation of transferrines, and silver stain. Clin Chem* 1998; 2: 351-3.
- Mehta PD and Patrick BA. *Detection of oligoclonal bands in unconcentrated CSF: isoelectric focusing and silver staining. Neurology* 1983; 33: 1365-83.
- Rouah E, Rogers BB, Buffone GJ. *Transferrin analysis by immunofixation as an aid in the diagnosis of cerebrospinal fluid otorrhea. Arch Pathol Lab Med* 1987; 111: 756-7.
- Willoughby EW and Lambert A. *A sensitive silver stain for proteins in agarose gel. Anal Biochem* 1983; 130: 353-8.
- Mehta PD, Mehta SP, Patrick BA. *Silver staining of unconcentrated cerebrospinal fluid in agarose gel (Panagel) electrophoresis. Clin Chem* 1984; 30: 735-6.
- Pette D and Stupp I. *Die -fraktion im liquor cerebrospinalis. Klin Wschr* 1960; 38: 109-10.
- Laterne EC. *Les proteines du liquide cephalorachidien a l'Etat normal et pathologique. Arscia, Brussels,* 1965, 172-5.
- Tripathi RC, Millard CB, Tripathi BJ, Noronha A. *Tau fraction of transferrin is present in human aqueous humor and is not unique to cerebrospinal fluid. Exp Eye Res* 1990; 50: 541-7.
- Laurell CB. *Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. Anal Biochem* 1966; 15: 45-52.
- Ritchie RF and Smith R. *Immunofixation. 1. General principles and application to agarose gel electrophoresis. Clin Chem* 1976; 22: 497-9.
- Keren DF, Warren JS, Lowe JB. *Strategy to diagnose monoclonal gammopathies in serum: high-resolution electrophoresis, Immunofixation, and / quantification. Clin Chem* 1988; 34: 2196-201.