

# Multiplex Latex Bead 유세포 분석기 기법과 Quellung 반응을 이용한 폐구균 혈청형 분석 비교

최경민 · 연수인\* · 김은숙\* · 신전수\* · 용동은<sup>†</sup> · 이경원<sup>†</sup> · 김동수

연세대학교 의과대학 소아과학교실, 미생물학교실\*, 진단검사의학과<sup>†</sup>

= Abstract =

## Comparison of Multiplex Latex Bead Flow Cytometric Analysis and Quellung Analysis in Serotyping Pneumococci

Kyong Min Choi, M.D., Soo In Yeon\*, Eun Sook Kim\*, Jeon Soo Shin, M.D\*.  
Dong Eun Yong, M.D.<sup>†</sup>, Kyoung Won Lee, M.D.<sup>†</sup> and Dong Soo Kim, M.D.

*Departments of Pediatrics, Microbiology\* and Laboratory Medicine<sup>†</sup>,  
College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea*

**Purpose :** The serotyping results of the Quellung reaction was compared with the newly developed multiplex latex assay and the sensitivity of the Quellung reaction was compared.

**Methods :** We checked the serotypes of 35 samples obtained from patients treated at Yonsei University Medical Center using the multiplex latex bead method and compared the results with the serotypes previously obtained via the Quellung reaction.

**Results :** A decrease in the mean fluorescence was detected in the samples tested with the multiplex assay. Seventeen samples out of the 27 samples agreed to the results of the Quellung assay. We were only able to confirm the concordance of 11 serotypes out of 14 serotypes available.

**Conclusion :** The Quellung reaction is time consuming procedure and prone to errors even with expertise in the procedure, and other alternate methods in serotyping have been investigated to overcome these problems. The newly developed multiplex latex bead assay can test more samples at the same time and has a higher degree of sensitivity. A large scale trial is required to test the sensitivity of the new assay across various serotypes along with efforts to increase the sensitivity of the Quellung assay. The preliminary data suggests that this method may be widely used.

**Key Words :** Pneumococci, Serotype, Quellung reaction, Multiplex latex bead flow cytometry analysis

### 서    론

이 논문은 BK 21 의과학 사업단 연구비로 지원받았음.  
책임저자 : 김동수, 연세대학교 의과대학 소아과학교실  
Tel : 02)2228-2057, Fax : 02)393-9118  
E-mail : dskim6634@yumc.yonsei.ac.kr

폐구균은 소아 세균성 감염의 중요 원인균으로  
병원 내 감염이 아닌 지역 사회 획득 폐렴의 가장

중요한 원인균이며, 이 외에도 다양한 질병을 유발한다. 특히, 2세 미만의 소아와 노령층에서 폐구균에 의한 침습성 질환에 높은 감수성을 보여 소아에서는 중이염, 부비동염, 폐렴 등의 비침습성 질환 뿐 아니라 균혈증, 뇌수막염 등의 침습성 질환이 발병하게 된다<sup>1)</sup>. 그러나, 항균제 등의 발달에도 지속적인 항생제 내성의 증가로 그 치료에 많은 어려움이 있어 폐구균에 의한 균혈증은 아직까지도 높은 사망률을 보이고 있는 상태이다<sup>1)</sup>. 미국의 경우 인구 10만명당 매년 68~260명의 빈도로 폐구균성 폐렴이 발생하여 이중 5%가, 균혈증은 7~25명 정도 발생하며 이중 20%가, 뇌막염은 1.2~1.8명 정도 발생하며 이중 30%가 사망한다<sup>2~4)</sup>.

폐구균은 피막(capsule)을 가진 그람양성세균으로 피막 다당질(polysaccharide, PS)의 특성에 따라 90개의 혈청형으로 분류된다<sup>5)</sup>. 그 중 일부의 혈청형들이 사람에게 심각한 질환을 일으키는데, 특히 이러한 혈청형의 분포는 나라와 지역에 따라 다른 차이를 보이고 있으며<sup>6~11)</sup>, 폐구균 혈청형 분포 파악은 질병 관리 측면에서 매우 중요한 의미를 지닌다. 7가 백신이 도입된 이후 혈청형의 분석은 더욱 중요한 의미를 가지게 되었는데, 이는 7가 폐구균 단백 결합 백신의 효과를 정확히 판정하기 위해서는 폐구균 혈청형 분포에 대한 자료가 필수적이기 때문이며, 각 지역의 폐구균 혈청형 분포에 따라 예방接種의 효과가 다르게 나타날 수 있기 때문이다.

현재 폐구균 혈청형 분석은 Quellung 반응을 표준으로 이용하는데, 이 방법은 수십 가지의 비싼 항혈청을 필요로 하며 수기로 실험하므로 결과판정에 숙련성이 요구된다<sup>12)</sup>. 또한 판정에 많은 시간을 필요로 하므로 다량의 검체를 검사하는데 제한이 있다<sup>12)</sup>. 따라서 Quellung 반응을 대체할 수 있는 다양한 방법의 혈청형 분석법이 현재 시도되고 있는 상태이다<sup>13~16)</sup>.

본 연구에서는 혈청형 분석의 새로운 방법으로 제시되고 있는 multiplex latex bead를 이용한 유세포 분석기(flow cytometry) 기법<sup>17, 18)</sup>을 기존의 Quellung 반응 검사와 비교하여 두 방법 간의 일치 여부를 검토하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 폐구균 수집

Multiplex latex bead 유세포 분석을 위한 폐구균은 2001년 9월부터 2005년 7월까지 세브란스 병원에 내원한 308명의 환자로부터 분리된 308주의 폐구균을 대상으로 하였다. 이 중 Quellung 반응을 통해 혈청형 분석을 시행한 35주를 임의로 선택하였다. 35주 각각의 Quellung 반응에 의한 혈청형은 Table 1과 같다.

### 2. Quellung 반응

Quellung 반응은 폐구균 항혈청(Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark)을 이용해 시행하였으며, 폐구균을 각각의 항혈청과 반응시키고, methylene blue로 염색한 후 광학 현미경 상에서 유침 오일을 이용한 1,000배의 배율로 피막의 팽창을 관찰하여 양성 여부를 판정했다.

Table 1. Comparison between Quellung Reaction and Multiplex Latex Bead Flow Cytometry Assay

Serotype by Quellung reaction	No. of isolates examined	No. of isolates matched	No. of isolates unchecked
1	1	1	0
3	2	1	0
4	2	2	0
5	2	1	0
6A	4	3	0
6B	4	2	0
7F	2	1	0
9N	2	0	2
9V	2	1	0
14	2	1	0
18C	2	0	2
19A	4	0	4
19F	4	3	0
23F	2	1	0
Total	35	17	8

### 3. Multiplex assay

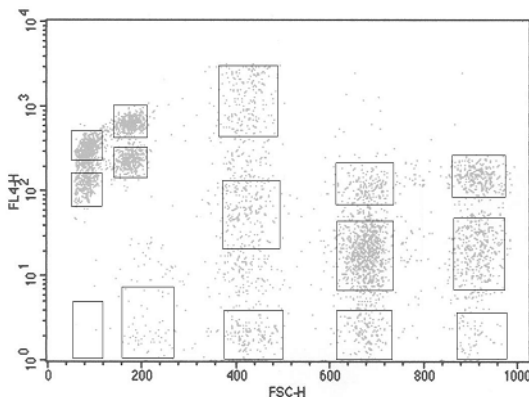
#### 1) 폐구균 다당체 항원 및 항체

균 용해질(lysate)은 혈액한천배지에서 배양된 폐구균 1개의 집락을 0.5% 효모 추출물을 포함한 0.3 mL의 Todd-Hewitt 배지에 넣고 37°C에서 6시간을 배양하였고, 다시 50 mL 용해 완충액(0.2% sodium deoxycholate, 0.02% sodium dodecyl sulfate, 0.3 M sodium citrate)를 넣고 1시간 더 배양하여 얻었다.

각 다당체에 대한 단클론 항체(1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F에 대한 각각의 단클론 항체)는 미국 University of Alabama의 Dr. Moon H. Nahm를 통해 항체생성 세포주 혹은 항체를 분양 받았으며, 각 다당체에 대한 단클론 항체가 없는 것(항형질 S, T, E, F)은 해당 혈청 형에 대한 토끼 혈청을 Statens Serum Institut에서 구입하여 사용하였다.

#### 2) Latex bead와 피막 다당체의 접합

Latex bead(Bangs Laboratories, Fishers, USA)는 5가지의 다른 크기(2~4.8 μm)를 선택한 후, 각 bead는 붉은 색 형광을 띠는 Did oil(분자 탐침자)과 섞어 밤새도록 교반시켰다. Did oil은 DMSO에 녹여 1~10 mg/mL, 1~5 mg/mL의 농도가 되도록 사용하며, 이후 각 bead를 0.25% Triton X-100으로 세척하여 보관하였다. 각 bead의 형광은 정도에 따라 형광이 없는 것, 중강도 형광, 고강도 형광을 띠



**Fig. 1.** Red Fluorescence and Forward Scatter of 15 Different Types of Beads. It shows latex beads of five different diameters ranging from 2 to 4.6 μm, dyed with Did oil to prepare them with three different levels of red fluorescence.

으로써 총 15가지가 유세포 분석기 상 구별이 가능하도록 하였다(Fig. 1).

각 종류의 bead를 피막 다당체(0.1% wt/vol)와 결합시킨 후 세척하여 희석 완충액(1% BSA, 0.05% Tween 20 PBS)에 보관하였다. 필요한 피막 다당체를 모두 결합시킨 후 각각 혹은 혼합 용액을 만들어 유세포 분석기(FACSCalibur; Becton Dickinson, San Jose, California)를 시행하였다.

#### 3) Multiplex latex bead 유세포 분석기 기법

각 다당체가 결합된 latex bead 혼합 용액(각 bead당 4 mL), 각 다당체에 대한 항체 혼합 용액 30 mL 그리고 폐구균 용액 30 mL를 96 well U 판(plate)의 웰(well)에 넣고 30분간 반응시킨 후, 각 웰을 0.05% Tween 20이 함유된 용액으로 세척한 후 FITC-결합 항면역글로불린을 넣어 30분간 반응시켰다. Bead를 다시 위와 같이 세척한 후 유세포 분석기를 시행하였다. 각 bead의 분포를 붉은 색 형광과 크기[전방산란(forward scatter)]로 확인한 후 15가지의 bead를 게이팅(gating)하고 FITC 형광 변화를 관찰하였다. 각 bead의 형광에 대한 기하평균(geometric mean) 값을 구하여 형광의 변화정도를 다음의 공식[(임상시료의 기하평균 - 배경의 기하평균)/(대조군 균의 기하평균 - 배경의 기하평균)]으로 구했다. 이때 배경의 기하평균은 bead 혼합액에 FITC-결합 항면역글로불린만을 넣어 얻은 것이다. 최대치의 형광은 피막이 없는 변종 폐구균의 용해물(피막 다당체가 없어 bead 혼합액과 항체 혼합액 결합에서 경쟁적 억제 못하므로 최대의 형광이 나타남)를 이용하여 얻었다. 계산값이 33% 이하로 감소되는 경우<sup>17, 18)</sup> 해당 혈청형으로 판정하였다.

#### 4. Multiplex latex bead 유세포 분석기 기법 및 Quellung 반응의 일치도 평가

다양한 폐구균을 이용하여 유세포 분석기 기법과 Quellung 반응을 실시한 후 두 검사법 사이의 결과 일치 여부를 비교하였다.

## 결 과

### 1. 대조군 다당질의 multiplex assay

대조군 다당질 검체로 제시된 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F에 대한 분석 결과 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14 및 23F에서 평균 형광치 값이 33% 이하로 감소됨을 확인하였다. 19F 혈청형의 경우 19A 및 19F 혈청형에 대한 평균 형광치 값의 감소를 확인한다. 혈청형 9N, 18C 및 19A 혈청형의 경우 33% 이하의 값을 보이지 않았고, 19F 혈청형의 경우 19F에서는 33% 이하의 값을 보였으나, 19A에서는 평균 형광치 값의 감소를 보이지 않았다. 이러한 결과는 실험을 반복한 경우에도 동일하게 나타났다.

### 2. Quellung 반응 및 단클론 항체를 이용한 폐구균 혈청형 분석 일치도 비교

새로운 방법을 통해 혈청형 분석이 가능한 것으로 알려진 혈청형 중 일부 혈청형에서 Quellung 반응 및 multiplex latex bead를 이용한 유세포 분석기 방법을 시행하여 혈청형을 비교 분석하였다(Table 1). 분석을 통해 비교가 가능했던 27개의 검체 중 두 방법 간의 혈청형이 일치한 경우는 17례였다. 비교 결과 Quellung 반응을 통해 19A로 판정되었던 1례는 19F로 추정되었다.

Multiplex latex bead를 이용한 유세포 분석기 방법에서 혈청형 9N, 18C 및 19A의 경우 대조군에서 형광 감소 반응을 관찰할 수 없어 비교가 불가능하였다. 그 외 일치하지 않는 10주의 경우 Quellung 반응에서의 실험자에 의한 오차에 의한 것으로 생각되어 진다. 최종 혈청형에 대한 결정은 Quellung 반응의 재검을 통해 시행 예정이다.

## 고 찰

폐구균은 약 90여개의 혈청형이 존재하고 있으나, 이중 일부의 혈청형들이 사람에게 중요한 질병을 유발한다. 이러한 혈청형의 분포는 시대와 지역에 따라 차이를 보이기 때문에 각 시대, 지역 별로 정확한 혈청형 분포에 대한 조사가 필수적이다. 실

례로 1928~1998년까지 분리된 폐구균 중 7가 폐구균 단백 결합 백신에 포함된 혈청형 관련 질환은 15%에서 59%로 증가하였으나<sup>19)</sup>, 7가 폐구균 단백 결합 백신 도입 이후 7가 폐구균 단백 결합 백신에 포함되지 않은 혈청형이 7가 폐구균 단백 결합 백신에 포함된 혈청형을 대체하여 그 빈도가 높아지고 있다<sup>20-22)</sup>. 따라서 폐구균 혈청형 분포에 대한 지속적인 조사가 매우 중요하다고 하겠다. 이러한 조사를 통해 예방 접종에 포함되어야 할 혈청형을 결정할 수 있을 뿐 아니라, 현재 시행 중인 폐구균 예방접종의 정확한 효용을 판정할 수 있다. 폐구균 백신은 고가이므로 경제적 부담이 막대하여 선진국에서는 자국의 예방접종에 따른 폐구균 혈청형 분포의 변화를 파악하여 적절한 예방접종 정책을 세우는 기초로 활용하고 있다. 그러나 백신에 의한 항체는 해당 혈청형 및 일부 교차 항원성을 갖는 폐구균에만 예방 효과를 나타내므로 7가 백신에 예방 가능한 혈청형이 적고 지역마다 혈청형 분포가 달라 백신의 효용성에 문제점이 제기되었다<sup>23)</sup>. 실제로 년도에 따라 다른 폐구균 혈청형이 관찰되었고<sup>24)</sup>, 7가 백신 접종 후 폐구균 혈청형의 변화가 나타나고 있다. 따라서 우리 나라의 폐구균 혈청형 분포에 대한 지속적 조사가 매우 필요하며, 이를 통해 향후 우리 나라 폐구균 예방 접종 정책 수립에 도움을 줄 수 있을 것이다.

본 연구에서는 현재 폐구균 혈청형 분석을 위해 사용되고 있는 Quellung 반응을 대체할 새로운 방법으로 제시되고 있는 multiplex latex bead를 이용한 유세포 분석기 기법<sup>17, 18)</sup>을 기존의 Quellung 반응과 비교하여 그 적용 가능성 여부를 검토해 보고자 하였다. 이 새로운 방법에서는 현재 사용되고 있는 7가, 혹은 11가 폐구균 단백 결합 백신에 포함되어 있는 혈청형에 대한 단클론 항체를 사용함으로써 보다 객관적이고 빠른 시간에 검사가 이루어지도록 한 것이 특징이라 하겠다. 이 방법은 또한 다량의 검체를 동시에 검사함으로써 기존의 Quellung 반응에 비해 좀더 빠른 혈청형 판독을 가능하게 한다. 또한 Quellung 반응 시 필연적으로 존재하는 검사자에 의한 오류를 차단하는 효과가 있다. 기존 Quellung 반응의 경우 수기로 이루어지는 검사의 특성 상 검사 시행에 많은 시간과 노력

이 소요되어, 하루 10여개 이상의 검체를 검사하기가 힘들었다. 또한 검사 수행을 위해서는 숙련된 연구원을 필요로 하는 증의 제한점이 있었으며, 숙련된 연구원이라도 약 10% 정도의 오차를 나타내어<sup>12)</sup>, 다량의 검체를 정확히 검사하기에 한계가 있다. 이러한 오차의 발생은 백신 포함 혈청형의 결정에 있어 심각한 오류를 초래하여, 고가의 예방접종을 시행함에도 실제 접종 효과의 감소라는 예기치 못한 결과를 가져올 수 있다. 이러한 문제점들로 인해 Quellung 반응을 대체하기 위한 counter 면역 전기영동, 공동응집 검사, 라텍스 응집반응검사, 젤 확산검사 등의 방법이 시도되고 있으나<sup>25, 26)</sup>, 아직까지 Quellung 반응을 대체하지는 못하는 상태이다.

제시된 방법에 따라 실험을 진행한 결과 대조군으로 제공받은 다당질 검체 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14 및 23F의 경우 원하던 결과를 얻을 수 있었으나, 9N, 18C 및 19A 혈청형의 경우 33% 이하의 값을 보이지 않았으며, 19F 혈청형의 경우 19F에서만 33% 이하의 값을 보였다. 이러한 결과는 실험을 반복했을 때도 동일하게 나타났다. 이러한 결과는 제공받은 bead의 시간 경과에 따른 유효성 감소에 의한 것으로 생각되어 진다. 향후 bead의 유효성이 유지될 수 있는 시간 내에서 재검도가 필요할 것으로 생각된다. 대조군으로 제시되고 있는 혈청형에 대한 양성 반응이 모두 확인된 것은 아니지만 현재까지의 예비 결과로 볼 때 그 적용 가능성은 매우 높다고 할 수 있겠다. Quellung 반응과 비교할 때 보다 다량의 검체를 빠르게 분석할 수 있는 장점을 확인할 수 있었다. 그러나, 향후 보다 많은 검체를 대상으로 반복적인 검증이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

Multiplex 방법을 통한 혈청형 분석과 기존 Quellung 반응에 의한 혈청형 분석을 14개 혈청형을 이용하여 비교한 결과 새로운 방법을 보다 확대하여 시행하는 것이 필요할 것으로 생각된다. 대조군의 결과 부족으로 비교가 불가능했던 3개 혈청형을 제외한 11개 혈청형의 27검체 중 17검체에서 혈청형 분석이 일치하는 결과를 얻을 수 있었으나 그렇지 않은 혈청형에 대해서는 Quellung 반응의 재검 등을 통한 재확인 절차가 이루어져야 하며, 이러한

재확인 과정을 통해 혈청형 분석에 있어 좀 더 정확한 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다. 아울러, Quellung 반응의 정확도 향상을 위한 노력이 수반되어야 할 것이다. Quellung 반응의 정확도를 향상시키기 위해서는 편광 현미경과 같은 기기의 구비와 함께 전문 연구원의 양성과 같은 문제가 해결되어야 한다. 특히, 전문 연구원의 양성이 시급해 해결되어야 할 문제이나 이는 많은 시간과 노력이 수반되어야 하는 일로 많은 어려움이 예상된다.

유세포 분석기의 FL4 detector를 사용해야 하는 과정상의 어려움이 있지만, 향후 폐구균 혈청형 분석을 시행함에 있어 기존의 Quellung 반응의 단점을 보완한 새로운 방법의 적용이 가능할 것으로 사료된다.

## 요 약

**목 적 :** 현재 폐구균 혈청형 분석을 위해 사용중인 Quellung 반응과 비교하여, multiplex assay 방법에 의한 폐구균 혈청형 분석의 유용성을 확인하고, Quellung 반응에 의한 혈청형 분석의 정확성을 검증하였다.

**방 법 :** 연세 의료원 신촌 세브란스 병원에서 폐구균 감염이 확인된 환자로부터 분리된 35주의 검체를 이용하였다. Quellung 반응을 통한 혈청형 분석과 multiplex latex bead를 이용한 유세포 분석기 기법을 통한 혈청형 분석을 시행한 후 양 방법간의 혈청형 분석을 비교하였다.

**결 과 :** Multiplex assay 방법에 제시된 대로 각각의 혈청형에서 평균 형광치 값의 감소를 확인할 수 있었다. 비교를 위해 시행한 14개 혈청형 중 11개 혈청형에서 비교가 가능했으며, 분석 비교가 가능했던 27검체 중 17검체에서 혈청형이 일치하는 결과를 보였다.

**결 론 :** 기존의 Quellung 반응의 경우 혈청형 분석에 많은 시간과 노력이 소요되며 일정량의 오차가 발생하는 문제가 있어, 이를 보완하기 위한 새로운 방법들이 시도되고 있다. 향후 보다 많은 혈청형을 대상으로 multiplex latex bead를 이용한 혈청형 분석을 시행할 필요가 있으며 이를 통해 mul-

tplex assay와 Quellung 반응을 비교하며, Quellung 반응의 정확도를 올리기 위한 노력이 함께 수반되어야 할 것이다. 현재까지의 예비 결과로 볼 때 새로운 방법의 적용 가능성은 매우 높다고 할 수 있다.

### 감사의 글

이 연구는 BK 21 의과학 사업단 연구비의 지원을 받아 이루어졌음. Latex bead 및 단클론항체를 제공한 미국 Alabama 대학의 Dr. Moon H. Nahm 에게 감사를 전함.

### 참 고 문 헌

- 1) Fedson DS, Musher DM. Pneumococcal vaccine. In Plotkin SA, Mortimer EA, editors. Vaccines. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co 1994: 517-564.
- 2) Bartlett JG, Mundy LM. Community-acquired pneumonia. N Engl J Med 1995;333:1618-24.
- 3) Heffelfinger JD, Dowell SF, Jorgensen JH, Klugman KP, Mabry LR, Musher DM, et al. Management of Community-Acquired Pneumonia in the Era of Pneumococcal Resistance: A Report From the Drug-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Therapeutic Working Group. Arch Intern Med 2000;160:1399-408.
- 4) Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices(ACIP). MMWR Recomm Rep 1997;46:1-24.
- 5) Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol 1995;33:2759-62.
- 6) Syrjanen RK, Kilpi TM, Kaijalainen TH, Herva EE, Takala AK. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Finnish children younger than 2 years old. J Infect Dis 2001; 184:451-9.
- 7) Raymond J, Le Thomas I, Moulin F, Commeau A, Gendrel D, Berche P. Sequential colonization by *Streptococcus pneumoniae* of healthy children living in an orphanage. J Infect Dis 2000;181: 1983-8.
- 8) Gratten M, Gratten H, Poli A, Carrad E, Raymer M, Koki G. Colonization of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* in the upper respiratory tract of neonates in Papua New Guinea: primary acquisition, duration of carriage, and relationship to carriage in mothers. Biol Neonate 1986;50:114-20.
- 9) Sung RY, Ling JM, Fung SM, Oppenheimer SJ, Crook DW, Lau JT, et al. Carriage of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* in healthy Chinese and Vietnamese children in Hong Kong. Acta Paediatr 1995;84: 1262-7.
- 10) Appelbaum PC, Gladkova C, Hryniewicz W, Kojouharov B, Kotulova D, Mihalcu F, et al. Carriage of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* by children in eastern and central Europe-a multicenter study with use of standardized methods. Clin Infect Dis 1996;23:712-7.
- 11) Ekdahl K, Ahlinder I, Hansson HB, Melander E, Molstad S, Soderstrom M, et al. Duration of nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: experience from the South Swedish pneumococcal intervention project. Clin Infect Dis 1997;25:1113-7.
- 12) Konradsen HB. Validation of serotyping of *Streptococcus pneumoniae* in Europe. Vaccine 2005;23:1368-73.
- 13) Fenoll A, Jado I, Vicioso D, Casal J. Dot blot assay for the serotyping of pneumococci. J Clin Microbiol 1997;35:764-6.
- 14) Lafong AC, Crothers E. Simple latex agglutination method for typing pneumococci. J Clin Pathol 1988;41:230-1.
- 15) Lalitha MK, Pai R, John TJ, Thomas K, Jesudason MV, Brahmadathan KN, et al. Serotyping of *Streptococcus pneumon* by agglutination assays: a cost-effective technique for developing countries. Bull World Health Organ 1996;74: 387-90.
- 16) Lawrence ER, Griffiths DB, Martin SA, George RC, Hall LM. Evaluation of semiautomated

- multiplex PCR assay for determination of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and serogroups. J Clin Microbiol 2003;41;601-7.
- 17) Park MK, Briles DE, Nahm MH. A latex bead-based flow cytometric immunoassay capable of simultaneous typing of multiple pneumococcal serotypes(Multibead assay). Clin Diagn Lab Immunol 2000;7:486-9.
  - 18) Yu J, Lin J, Benjamin WH Jr, Waites KB, Lee CH, Nahm MH. Rapid multiplex assay for serotyping pneumococci with monoclonal and polyclonal antibodies. J Clin Microbiol 2005;43: 156-62.
  - 19) Feikin DR, Klugman KP. Historical changes in pneumococcal serogroup distribution: implications for the era of pneumococcal conjugate vaccines. Clin Infect Dis 2002;35:547-55.
  - 20) Pelton SI. Acute otitis media in the era of effective pneumococcal conjugate vaccine: will new pathogens emerge? Vaccine 2000;19(Suppl 1):S96-9.
  - 21) Kaplan SL, Mason EO Jr, Wald ER, Schutze GE, Bradley JS, Tan TQ, et al. Decrease of invasive pneumococcal infections in children among 8 children's hospital in the United States after the introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. Pediatrics 2004;113(3 Pt 1):443-9.
  - 22) Obaro SK, Adegbola RA, Banya WA, Greenwood BM. Carriage of pneumococci after pneumococcal vaccination. Lancet 1996;348:271-2.
  - 23) Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. Clin Infect Dis 2000;30:100-21.
  - 24) Finland M, Barnes MW. Changes in occurrence of capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* at Boston City Hospital during selected years between 1935 and 1974. J Clin Microbiol 1977;5:154-66.
  - 25) Arai S, Konda T, Wad A, Matsunaga Y, Okabe N, Watanabe H, et al. Use of antiserum-coated latex particles for serotyping *Streptococcus pneumoniae*. Microbiol Immunol 2001;45:159-62.
  - 26) Lalitha MK, Thomas K, Kumar RS, Steinhoff MC. Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* by coagglutination with 12 pooled antisera. J Clin Microbiol 1999;37:263-5.