

다중구슬 분석법에 의한 폐구균 혈청형 결정 연구

이화여자대학교 의과대학 소아과학교실*, 진단검사의학교실†, 서울대학교 의과대학 소아과학교실‡

조기영* · 이정아* · 조성은† · 김남희‡ · 이진아‡ · 홍기숙‡ · 이환중‡ · 김경호*

A study of serotyping of *Streptococcus pneumoniae* by multibead assay

Ky Young Cho, M.D.*, Jung Ah Lee, M.D.*, Sung Eun Cho, M.D.†, Nam Hee Kim, M.D.‡
Jin A Lee, M.D.‡, Ki Sook Hong, M.D.†, Hoan Jong Lee, M.D.‡ and Kyung Hyo Kim, M.D.*

Departments of Pediatrics* and Laboratory Medicine†, College of Medicine Ewha Woman's University
Department of Pediatrics, College of Medicine, Seoul National University‡

Purpose: *Streptococcus pneumoniae* is a major etiologic agent for pneumonia, meningitis, otitis media, and sepsis among young children. Multi-drug resistant strains have raised great concern worldwide, thus the importance of prevention with vaccines has been emphasized. However, vaccines may force the appearance of pneumococcal infections by nonvaccine serotypes. Thus, distribution of pneumococcal serotypes should be monitored to estimate vaccine efficacy. We used a new and efficient multibead assay in determining pneumococcal serotypes.

Methods: From January to February 2005, 643 children were recruited from ten day care centers to isolate pneumococci from their oropharynx. Pneumococcal serotyping was performed on 62 pneumococcal isolates from 60 children by multibead assay. This immunoassay required two sets of latex particles coated with pneumococcal polysaccharides and serotype-specific antibodies. Twenty four newly developed monoclonal antibodies specific for common serotypes and a pool of polyclonal rabbit sera for some of the less common serotypes were used.

Results: The most prevalent pneumococcal serotypes were serotype 6A, 19A, 19F, 23F, and 11A/D/F which accounted more than 50 percent of all the 62 pneumococcal isolates. We found that multibead assay can be performed very rapidly and objectively.

Conclusion: This multibead immunoassay was very useful in serotyping clinical isolates of *S. pneumoniae* because it was simple, reliable and fast. (**Korean J Pediatr** 2007;50:151-156)

Key Words: *Streptococcus pneumoniae*, Serotyping, Immunoassay

서 론

폐구균(*Streptococcus pneumoniae*)은 소아에서 중이염, 부비동염, 폐렴, 패혈증, 수막염 등의 질환을 일으키는 주요 원인 균이며 국소 감염증의 증거가 없는 특발성 균혈증의 가장 흔한 원인 균이다¹⁾. 특히 2세 미만의 소아는 폐구균의 중요 침습 인자인 다당질 항원에 대해 적절한 면역 반응이 어려워 침습성 중증 폐구균 질환의 위험과 빈도가 높다. 폐구균은 인체에서 인두의 상재균으로 비말을 통해 사람 간 전파되고, 상기도에 무증상으로 정착해 있기도 하지만 상기도염 등의 선행 요인이 있을 때 혈행

성 또는 직접 주위 조직 전파를 통해 감염을 일으키므로 인두에서 분리되는 폐구균 혈청형은 일반적으로 질병을 일으키는 혈청형과 비슷하다²⁻⁴⁾.

최근 여러 항생제에 내성을 보이는 폐구균이 많은 국가에서 증가되고 있으며⁵⁾ 특히 우리나라 소아에서 분리되는 폐구균의 페니실린 내성률은 70% 이상으로 매우 높다^{6,7)}. 전 세계적으로도 항생제 내성 폐구균 감염에 대해 적절한 항생제를 선택하고 이를 통해 합병증을 감소시키기 위한 지침 개발이 계속되고 있다^{8,9)}.

이와 같은 상황에서 효과적인 백신 사용에 의한 폐구균 감염증의 예방이 더욱 중요하여 이의 개발에 많은 연구와 노력이 진행되고 있다. 2000년에 영아 및 어린 소아에서도 접종 가능하여 이들의 침습성 감염에 대한 예방 효과가 우수한 7가 단백 결합 폐구균 백신이 개발되었다¹⁾. 그런데 90여 가지 폐구균 혈청형 중 일부만 포함되었기 때문에 이와 같은 백신의 도입을 위해서

접수: 2006년 8월 17일, 승인: 2006년 9월 13일

책임저자: 김경호, 이화여자대학교 동대문병원 소아과학교실

Correspondence: Kyung Hyo Kim, M.D.

Tel: 02)760-5363 Fax: 02)765-3855

E-mail: kaykim@ewha.ac.kr

는 백신을 사용하고자 하는 지역에서 분리되는 폐구균의 혈청형에 대한 기본 역학 자료가 필요하며, 도입된 후의 백신의 효과를 알기 위해서도 백신 사용 지역에서의 감염 원인으로서의 폐구균 혈청형의 분석이 필요하다. 또한 각 폐구균 혈청형 특이 항원은 각각 해당하는 혈청형에 대한 특이 항체를 유도하기 때문에, 백신에 포함된 혈청형에 의한 폐구균 감염은 줄어들더라도 백신에 포함되지 않은 혈청형에 의한 폐구균 감염은 상대적으로 증가할 수 있으며 이에 대한 결과도 최근 보고되었다¹⁰⁾. 또한 폐구균 혈청형의 분포는 다른 원인으로 인하여 변화할 수 있다고 보고되기도 하였다¹¹⁾.

그러므로 폐구균 단백질 결합 백신의 도입과 더불어 백신의 효과와 이에 의한 폐구균 질환의 역학 변화를 감시하기 위해서는 인두나 여러 가지 감염증에서 분리되는 폐구균의 혈청형 분석이 반드시 필요하다^{12, 13)}.

그러나 90여 가지의 혈청형을 보이는 폐구균의 혈청형 분석은 쉽지 않다. 현재까지 Quellung 방법을 이용한 혈청형 분석이 가장 널리 사용되는 표준 방법으로 인정되고 있으나 이는 숙련된 연구자가 반드시 필요하며 숙련된 연구자라 하더라도 결과의 생산에 시간이 많이 걸리고 간혹 관찰자에 따른 결과의 오류가 가능하다^{14, 15)}. 그 밖의 다양한 분석방법이 시도되고 있으나, 이들도 마찬가지로 제한점이 있다¹⁶⁻¹⁸⁾. 최근 단세포 항체를 이용한 다중구슬 분석법(multibead assay)으로 폐구균 혈청형을 분석하는 방법이 소개되었다^{14, 15)}. 이 방법은 숙련된 연구자가 반드시 필요하지 않고 빠른 시간에 많은 폐구균의 혈청형을 정확하게 분석 가능하다고 보고되었다. 본 연구에서는 국내에서 분리된 폐구균 혈청형을 이 방법으로 분석하여 보고하는 바이다.

대상 및 방법

1. 대상

2005년 1-2월 동안 서울 지역의 10개 유아원에 다니는 건강한 9세 이하 소아 643명을 대상으로 하였다. 이 중 1세 미만은

Table 1. Age Distribution of Children in 10 Day Care Centers and Number of Pneumococcal Isolates in Each Age Group

Age (year)	Number of children	Number of isolates (%)
<1	4	0 (0.0)
1	15	3 (20.0)
2	39	4 (10.3)
3	107	14 (13.1)
4	168	24 (14.3)
5	147	9 (6.1)
6	147	6 (4.1)
7	13	0 (0.0)
>7	3	0 (0.0)
Total	643	60 (9.3)

4명, 1세는 15명, 2세 39명, 3세 107명, 4세 168명, 5세와 6세 각각 147명이었고 7세 13명, 8세 1명, 9세 2명이었다(Table 1). 성별로는 남자 332명, 여자 311명이었다.

2. 폐구균 배양과 동정

침단에 calcium alginate가 있는 소독된 면봉(swab)으로 소아의 구인두 점막을 세게 문질러 검체를 채취해 즉시 수막구균 분리를 위해 수막구균 선택배지인 modified New York city medium에 접종하고 난 후 면봉은 다시 폐구균 분리를 위해 Stuart 수송배지에 넣어 3시간 이내에 검사실로 운반하였다. 검사실에서 각각의 면봉에 묻은 구인두 검체를 평판 배지에 접종하여 37°C에서 5% CO₂ 배양기에 배양하고 24시간과 48시간에 각각 관찰하였다. 폐구균 배양을 위한 선택 배지는 5% 면양 혈액을 포함한 혈액 한천 배지(blood agar plate)와 2.5 µg/mL gentamicin을 도포한 혈액 한천 배지를 사용하였다. 각 배지에서 단추 모양의 집락 형태와 α-용혈 양상으로 의심되는 집락을 선택하여 그람 염색, catalase 검사 및 optochin 검사로 폐구균을 동정하였다.

3. 폐구균 혈청형 분석

폐구균 혈청형 분석은 미국 University of Alabama-Birmingham의 Bacterial respiratory pathogen reference laboratory에서 처음으로 개발하여 사용하고 있는 단세포 항체를 이용한 다중구슬 분석법을 이용하였다^{14, 15)}. 이 방법을 설명하면 다음과 같다.

1) 폐구균 피막 다당질 혈청형으로 씌운 구슬 준비

직경이 2에서 4.8 µm인 5가지 종류의 구슬들(beads)(Bangs Laboratories, Fishers, IN, USA)을 구입하여 이들을 적색 형광에서 형광이 없는 것, 낮은 것 및 높은 것 등 3가지로 분류하기 위해 Did oil(1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate, Molecular probes, eugene, OR, USA)로 염색했다. 구슬에 Did oil을 염색하면서 dimethyl sulfoxide와 함께 실온에서 6 시간 동안 진동시켰다. 구슬의 염색 농도를 1에서 10 µg/mL은 저등급, 1에서 5 mg/mL은 고등급의 형광염색으로 분류하였다. 구슬은 0.25% Triton X-100으로 수차례 세척하였고 같은 용액에 보관하였다. 14가지 혈청형 폐구균 피막 다당질(1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F)을 14종류의 구슬들에 각각 부착시켰다. 이 14종류의 구슬들을 모두 혼합시켰고, 세트 1로 분류하였다. 다시 10가지 혈청형 폐구균 피막 다당질(2, 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20, 22F, 33F)을 10종류의 구슬들에 각각 부착시킨 후 혼합시키고 세트 2로 분류하였다. 혈청형 중 3, 18C, 6B, 9V, 19F 이외의 혈청형들로 부착된 구슬들은 American type culture collection(Manassas, VA, USA)에서 구입한 피막 다당질로 입혔고 위의 5가지 혈청형들은 안정성을 증가시키기 위해 피막 다당질-단백 결합물질로 입혔다.

2) 폐구균 용해물의 준비

폐구균을 면양배지에 접종하여 6시간 동안 37°C의 촛불 단지(candle jar)에서 배양하였다. 각 배지에서 나온 폐구균 균주들을 실험 튜브에 넣고 0.5% 효모 추출액, 1% 포도당, 1% 면양적혈구(Colorado serum company, Denver, CO, USA)로 보충된 0.3 mL의 Todd-Hewitt broth(Difco laboratories, detroit, MI, USA)를 부었다. 37°C에서 6시간 동안 배양시킨 후에, 배양균을 50 µL의 용해 완충액(0.2% sodium deoxycholate, 0.02% sodium dodecyl sulfate, 0.3 M sodium citrate)과 혼합했다. 다시 37°C에서 15분 동안 배양시킨 후에 세포 용해물을 5분 동안 10,000×g에서 원심분리 하였다. 상층액은 완충액으로 5배 희석시켰다.

3) 다중구슬 분석법을 이용한 혈청형 분석

이렇게 준비된 40-56 µL(set 1은 56 µL, set 2는 40 µL) 라텍스 구슬 혼합체(각 혈청형 당 4 µL), 30 µL의 희석된 세균 배양 용해물과 30 µL의 혈청형 특이 항체를 U 형 바닥을 가진 96 well의 평판(Nalgen Nunc International, Rochester, NY, USA)에 접종하였다. 희석액은 1% 우혈청 알부민이 포함된 인산 완충 용액을 사용하였다. 세트 1에 사용된 혈청형 특이 항체는 14종류의 단세포 항체 혼합체이다. 세트 2에 사용된 혈청형 특이 항체는 Statens Serum Institute(Copenhagen, Denmark)에서 구입하였으며 40 µg의 세포벽 다당질을 포함한 희석 완충액으로 600배 희석한 토끼 폐구균 항혈청 S, T, E, F을 동량으로 혼합한 것이다. 실온에서 30분 동안 배양한 후에 구슬들을 0.05% Tween 20과 0.05% sodium azide를 포함한 200 µL의 식염수로 세척하였고, 여기에 형광 결합된 항 면역글로블린 항체의 혼합물을 첨가시켰다. 세트 1 구슬에는 사람과 쥐에 대한 형

광 결합 항 면역글로블린(Sigma, St. Louis, MO, USA)이 사용되었다. 세트 2 구슬에는 토끼에 대한 형광 결합 항 면역글로블린 혈청(Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA)이 사용되었다. 실온에서 30분 동안 배양한 후 구슬들을 세척하고, 유세포 분석기(FACSCalibur; Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 구슬들의 형광을 측정하였다. 결과는 Cell Quest software(Becton Dickinson San Jose, CA, USA)로 분석했다. 이 검사는 일종의 억제검사(inhibition assay)로서, 검사하고자 하는 폐구균 용해액을 넣지 않는 well의 형광에 비해 넣은 well에서 형광이 67% 이상 감소할 때 이 혈청형을 검사하고자 하는 폐구균의 혈청형으로 결정하였다. Fig. 1에는 폐구균 용해액 검사로 혈청형 9V가 나온 예를 보여주는 그림으로 왼쪽에는 1:5 희석에서 오른쪽에는 1:20 희석에서 폐구균 용해액을 넣었을 때 형광이 67% 이상 감소한 결과를 보여준다(Fig. 1).

결 과

1. 폐구균 분리율

전체 유아원 소아 643명 중 60명에게서 폐구균이 분리되어 전체 소아에서의 폐구균 분리율은 9.3%이었으며 소아가 다니는 유아원에 따라 분리율에 의미 있는 차이가 있어 2.5-19.3%의 분포를 보였다. 나이에 따라서는 1세에서 20.0%로 가장 높았으며 4세 14.3%, 3세 13.1% 순이었고 1세 미만, 7세 및 8세 이상에서는 한 균주도 분리되지 않아 나이에 따라 분리율에 차이를 보였다(Table 1).

그런데 60명의 소아에서 분리된 폐구균 혈청형 분석 과정에서 60명의 소아 중 59명에게서는 각각의 소아 검체에 대해 한 개의 폐구균 혈청형이 확인되었지만 1명의 소아 검체에서 분리된 폐구균은 혈청형 확인 과정에서 3개의 혈청형이 동시에 분리

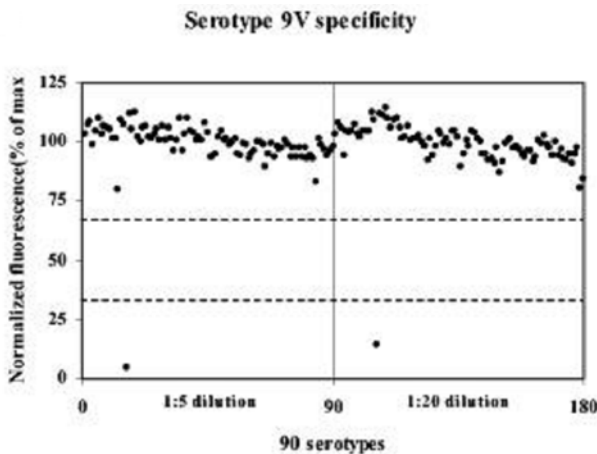


Fig. 1. Normalized fluorescence for 9V serotype is shown. The pneumococcal lysates used were diluted 1:5 (left half of each panel) or 1:20 (right half of each panel). Each dot represents normalized fluorescence for one serotype. Dotted lines indicate 33 and 67% of normalized fluorescence. Low normalized fluorescence (less than 33%) was produced with 9V lysate alone. All other serotypes produced normalized fluorescence of greater than 67%.

Table 2. Serotyping Results of 62 Pneumococcal Isolates from Children with Multibead Assay

Serotypes	Number of isolates (%)
6A	10 (16.1)
19A	7 (11.3)
23F	6 (9.7)
19F	5 (8.1)
11A/11D/11F	5 (8.1)
3	3 (4.8)
14	3 (4.8)
9V	2 (3.2)
1	1 (1.6)
6B	1 (1.6)
9N/9L	1 (1.6)
10A/10B/39/33C	2 (3.3)
Nontypable	16 (25.8)
Total	62 (100.0)

되어 이 소아는 3가지의 혈청형을 동시에 인두에 보균하고 있던 것으로 확인되었다.

2. 혈청형

혈청형으로 확인 분리된 최종 62균주의 혈청형 결과는 다음과 같다. 혈청형 6A가 10균주(16.1%)로 가장 많았고, 19A 7균주(11.3%), 23F 6균주(9.7%), 19F와 11A/11D/11F 가 각각 5균주(8.1%)의 순이었다(Table 2). 이들 5가지 혈청형은 모두 33균주로 전체의 53.2%를 차지하고 있었다. 7가 단백결합백신에 포함된 혈청형인 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F에 속하는 경우는 모두 17균주로 전체 중 27.4%였으며 백신 관련 혈청형인 6A, 19A 및 9N/9L을 포함시키면 총 62주 중 35주로 56.5%가 해당되었다.

3. 혈청형 분석

본 혈청형 분석에서는 set 1으로 14가지 폐구균 혈청형(1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F)을 확인할 수 있는데 본 연구에서 분리된 62균주 중 set 1로 분류 가능했던 균주는 39균주였고 set 2(2, 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20, 22F, 33F)로 분류 가능했던 균주는 7균주이었다. 24가지 혈청형으로 이루어진 두 세트를 이용하여 측정할 수 없었던 혈청형들로는 16균주(25.8%)가 확인되었다. 이 중 한 소아에서 분리된 폐구균은 혈청형 분석 과정에서 set 1에서 23F와 6A가 동시에 존재하는 것으로 확인되었고 또한 set 2에서 10A/10B/39/33C 혈청형도 분리되어 한 소아에 3가지 혈청형의 폐구균이 동시에 보균되어 있던 것으로 밝혀졌다.

고 찰

이번 연구에서는 소아 643명 중 60명에게서 구인두 폐구균을 분리하였으며, 혈청형 분석과정에서 이 중 한 소아가 3가지의 혈청형을 동시에 보균한 것으로 확인되어 총 62개의 폐구균 혈청형을 분리할 수 있었다. 본 연구에서 사용한 단세포 항체를 이용한 다중구슬 분석법에 의한 혈청형 분석을 이용하면 기존의 Quellung 분석 방법보다 더 빠르고 객관적으로 혈청형 분석이 가능함을 확인할 수 있었고 또한 동시에 섞여 있던 3가지의 폐구균 혈청형을 정확하게 분리, 확인하여 최근 많은 연구의 초점이 되고 있는 한 사람에서의 다혈청형 동시 보균을 확인하였고 이에 관한 연구 방법으로도 적절히 사용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

폐구균은 피막 다당질의 혈청학적 특성에 의하여 현재까지 90여 가지의 혈청형이 알려져 있다. 이 중 일부 혈청형은 다당질 상호간에 물리화학적 성질 및 항원성의 유사성이 있다. 그런데 혈청군 6, 14, 18, 19 및 23에 속하는 혈청형들이 임상 검체 분리주의 대부분을 차지하는 것으로 알려져 있으나 각 혈청형의 분포는 시기와 장소에 따라 다르다^{12, 13}. 한 예로 미국의 Boston

City Hospital에서의 경우 1970년대 이전에는 혈청형 1이 폐구균 폐렴의 50% 이상을 차지하였으나 1978년 이후에는 혈청형 1에 의한 폐렴은 거의 없어졌다¹¹. 최근 이 병원에서는 혈청군 6, 14, 18, 19, 23 이 분리된 균주의 대부분을 차지하였으며 폐구균 중이염의 경우 이 5가지 혈청군에 속하는 혈청형이 63% 정도를 차지하였고, 폐구균 균혈증의 76%를 차지하였다¹¹. 1984년부터 1993년까지 Connecticut에 있는 소아들에게서 침습성 감염을 유발한 폐구균의 혈청형 분석에 관한 전향적 연구에 의하면 혈청형 14가 전체의 29%를 차지하였고 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 와 23F의 7가지 혈청형이 침습성 감염의 84% 및 2세 미만의 침습 감염의 86%를 차지하였다¹⁹. 우리나라에서는 Lee 등⁶에 의한 1991년부터 1993년까지 폐구균 131균주에 대한 혈청형 분석에서 혈청형 6A, 6B, 14, 19F와 23F가 전체의 67%를 차지하였다.

본 연구에서는 62균주에 대한 혈청형 분석에서 혈청형 6A, 19A, 19F, 23F, 11A/11D/11F가 전체의 53.2%를 차지하고 있었으며 혈청형 19A의 경우 국내에서 1998년 이전에는 4%를 차지하였으나 본 연구에서 12%로 확인되어 상대적 빈도가 높아졌다²¹.

7가 단백 결합 백신에는 혈청형 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F의 7가지 혈청형이 포함되어 교차반응 혈청형을 고려하면 백신에 포함된 혈청형과 같은 혈청군에 속하는 6A, 9A, 9L, 9N, 18F, 18A, 18B, 19A, 19B, 19C, 23A, 및 23B 등도 포함된다²⁰. 본 연구에서는 구인두 검체에서 얻은 폐구균 62균주 중 27.4%가 7가 백신에 포함된 혈청형이었으며 교차 반응 혈청형을 고려하면 56.5%가 포함되었다. 2000년 이후 7가 폐구균 단백 결합 백신이 영아에게 기본 접종으로 사용된 미국에서는 백신 혈청형에 의한 폐구균 감염은 감소하였음이 보고되었다²¹. 그러나 백신 관련주로서 7개 백신에는 포함되지 않았으나 관련주에 의해 예방 가능하리라고 생각되었던 19A에 의한 침습성 폐구균 감염의 예가 증가됨이 보고되고 있다²¹. 이와 같은 결과는 폐구균 예방 접종이나 백신 개발 및 그 효과의 판단을 위해서는 지역사회에서 감염의 원인되는 여러 가지 폐구균 질환에서 우세한 혈청형분포에 대한 연구가 반드시 필요하며 혈청형 변화의 역학 감시 등에 대한 연구가 계속 진행되어야 함을 보여주는 결과이다²².

본 연구에서는 보균자 한 명에서 23F, 6A 및 10A/10B/39/33C의 3가지 폐구균 혈청형이 동시에 발견되어, 여러 혈청형의 폐구균이 동시에 보균 될 수 있음을 확인하였다. 다혈청형 동시 보균율이 오스트리아 소아에서 7.5%²³, 파푸아뉴기니에서 29.5%로 보고되고 있다²⁴. 현재 여러 혈청형이 보균될 수 있음이 확인되고 있는 상황에서, 이 혈청형들을 분석하는 데에 어려움이 있다. 주된 다수의 혈청형을 알아 낸 뒤에, 동시에 보균되고 있는 소수의 혈청형을 알아내는 과정이 필요하므로 더 예민하고 정확한 혈청형 분석 방법이 필요하다. 따라서 본 연구에서 사용한 다중 구슬 분석법이 이와 같은 연구를 시행하기에는 매우 적절한 방법이다.

지역과 시기에 따라 폐구균의 혈청형 분포가 다를 수 있으므로, 백신의 개발 시 특정 지역과 시기에 따른 혈청형의 파악은 필수적이다. 그런데 이를 위해 그동안 시행된 표준 방법인 Quellung 방법은 경제적, 시간적으로 많은 노력이 필요하다. 이를 극복하기 위해 면역탁본법(Immunoblot)이나 PCR을 이용한 방법이 제시되고 있다^{10, 25-27}). 그러나 이 방법들도 결과가 정량적이지 않고 결과 해석을 위해서는 오랜 경험의 숙련된 연구자가 필요하다. 또한 임상적으로도 20개 이상의 혈청형이 혼하기 때문에 많은 수의 혈청형을 동시에 검사하는 것은 필수적이다.

Quellung 분석 방법은 현재 폐구균 혈청형 분석의 기준 방법으로 사용되고 있다²⁸). 이 방법은 혈액한천배지에 자란 5-7개 폐구균 집락을 brain heart infusion broth 에 섞어 37°C 5% CO₂에서 12-18시간 증균한 균액 1.5 μL와 덴마크 Statens Serum Institut에서 공급하는 폐구균 항혈청 1.5 μL을 유리 슬라이드에 혼합한 후 커버슬라이드를 덮고 위상차 현미경에서 immersion oil을 사용하여 1,000배 배율로 관찰하여 폐구균 피막의 부풀 정도를 보면서 판독하는 것이다¹²). 이는 노동력을 요하고 숙련된 경험이 필요할 뿐만 아니라 분석을 위해 검체의 양이 많이 필요하여 기술자에 의한 오류도 늘 가능한 위험 요소이다²⁹).

이번 연구에서 실행한 다중구슬 분석법의 가장 큰 장점은 특정 혈청형 특이 시약인 혈청형 특이 단세포 항체를 사용했다는 점이다. 여기에서 사용된 단세포 항체들은 영구적인 기준 혈청형 시약이 될 수 있다. 또한 토기 항혈청을 사용하여 보편적으로 이용할 수 있다는 실용적인 면도 있다¹⁴). 다른 장점으로는 결과 분석이 매우 빠르고 대부분의 세균 용해물을 20배 희석을 해서도 판독 할 수 있을 정도로 예민하며, 폐구균 혈청형 분석에 있어 재현이 가능하고 객관적이라는 것이다. Quellung 분석이 관찰자의 주관적 해석이 중요한 요인이라는 것과 비교해 볼 때 매우 매력적인 장점이 아닐 수 없다. 또한 현재 임상적으로 질병을 일으키는 폐구균 혈청형의 90% 이상을 차지하는 23개 폐구균 백신에 포함된 혈청형들에 6A를 추가한 혈청형들을 구슬들에 부착해 놓았기 때문에 임상적으로 의미가 있는 폐구균 혈청형을 판독하는데 있어 매우 실용적이다. 종합해 보면 다중구슬 분석법은 기존의 방법과 비교해 더 빠르고 경제적이며 정확한 혈청형 결정을 할 수 있는 방법으로 제시될 수 있다.

결론적으로 다중구슬 분석법은 세균의 혈청형 분석에 있어 많은 장점을 가지고 있으며 많은 양의 세균을 다루면서 정확하고 정량적인 결과를 도출할 수 있으므로 향후 폐구균 혈청형 연구를 위한 기준 방법으로 제시될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구를 위해 많은 도움을 주신 University of Alabama-Birmingham, Department of Microbiology and Immunology 의 Nahm MH, M.D.께 감사드립니다.

요 약

목적 : 폐구균은 영유아와 소아에서 세균성 수막염, 중이염, 폐렴 등의 주요한 원인균이다. 최근 전 세계적으로 여러 항균제 내성을 보이는 폐구균이 증가하는 추세여서 폐구균 단백질 결합 백신의 도입과 함께 폐구균의 예방이 중요시되고 있다. 백신이 특이 혈청형에 대한 항체를 유도하기 때문에 백신에 해당하지 않는 혈청형의 폐구균의 감염율이 상대적으로 증가할 수 있다. 이와 같은 배경에서 폐구균 질환의 역학을 이해하기 위해서는 임상 검체나 인두에서 분리된 폐구균의 혈청형 분석이 필요하다. 이번 연구에서는 새롭게 제시되고 있는 효과적이고 정확한 다중구슬 분석법을 이용하여 폐구균 혈청형을 분석하였다.

방법 : 2005년 1-2월 동안 서울 지역의 10개 유아원에서 9세 이하 소아 643명을 대상으로 calcium alginate 면봉으로 구인두 점막을 문질러 검체를 얻고 60명의 소아에서 폐구균을 분리하였다. 이들 60명에서 다중구슬 분석법으로 혈청형을 분석하여 62 균주의 혈청형을 분리하였다. 다중구슬 분석법은 폐구균 다당질과 혈청형 특이 항체로 덮혀진 두 종류의 라텍스 세트를 이용하였다. 이 두 세트는 24가지 혈청형으로 이루어져 있고, 이 혈청형들은 임상적으로 의미 있는 질환을 일으키는 폐구균 혈청형의 90% 이상을 차지하는 혈청형들이다.

결과 : 이번 연구에서 분리된 62균주에서 혈청형 6A, 19A, 19F, 23F, 11A/11D/11F이 전체의 53.2%를 차지하고 있었다. 다중구슬 분석법으로 62 균주의 혈청형을 정확하고 빠르게 연구할 수 있었다.

결론 : 다중구슬 분석법은 폐구균 혈청형 분석에 정확하고 정량적인 결과를 도출할 수 있었고 향후 폐구균 혈청형 연구를 위한 기준 방법으로 제시할 수 있다.

References

- 1) American Academy of Pediatrics, Committee on Infectious Diseases. Policy statement: Recommendations for the prevention of pneumococcal infections, including the use of pneumococcal conjugate vaccine(Prevnar), pneumococcal polysaccharide vaccine and antibiotic prophylaxis. Pediatrics 2000;106:362-6.
- 2) Gray BM, Converse GM 3rd, Dillon HC Jr. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. J Infect Dis 1980;142:923-33.
- 3) Austrian R, Howie VM, Ploussard JH. The bacteriology of pneumococcal otitis media. Johns Hopkins Med J 1977;141:104-11.
- 4) Luotonen J. *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in nasal cultures during acute otitis media. Acta Otolaryngol 1982;93:295-9.
- 5) Klugman KP. Pneumococcal resistance to antibiotics. Clin

- Microbiol Rev 1990;3:171-96.
- 6) Lee HJ, Park JY, Jang SH, Kim JH, Kim EC, Choi KW. High incidence of resistance to multiple antimicrobials in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* from a university hospital in Korea. Clin Infect Dis 1995;20:826-35.
 - 7) Choi EH, Lee HJ. Clinical outcome of invasive infections by penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Korean children. Clin Infect Dis 1998;26:1346-54.
 - 8) Turett GS, Blum S, Fazal BA, Justman JE, Telzak EE. Penicillin resistance and other predictors of mortality in pneumococcal bacteremia in a population with high human immunodeficiency virus seroprevalence. Clin Infect Dis 1999;29:321-7.
 - 9) File TM Jr. Appropriate use of antimicrobials for drug-resistant pneumonia: focus on the significance of beta-lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Clin Infect Dis 2002;34:S17-26.
 - 10) O'Brien KL, Nohynek H. World Health Organization Pneumococcal Vaccine Trials Carriage Working Group. Report from a WHO Working Group: standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*. Pediatr Infect Dis J 2003;22:e1-11.
 - 11) 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.
 - 12) Lee JA, Kim NH, Kim DH, Park KW, Kim YK, Kim KH, et al. Serotypes and penicillin susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolated from clinical specimens and healthy carriers of Korean children. J Korean Pediatr Soc 2003; 46:846-53.
 - 13) Jefferson T, Ferroni E, Curtale F, Giorgi Rossi P, Borgia P. Streptococcus pneumoniae in western Europe: serotype distribution and incidence in children less than 2 years old. Lancet Infect Dis 2006;6:405-10.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) Fenoll A, Jado I, Vicioso D, Casal J. Dot blot assay for the serotyping of pneumococci. J Clin Microbiol 1997;35:764-6.
 - 17) Holliday MG. Pneumococcal typing by polyvalent counter-immunoelectrophoresis(PIE). J Immunol Methods 1981;46: 243-9.
 - 18) Kaldor J, Asznowicz R, Dwyer B. Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* by latex agglutination. Pathology 1988;20:45-7.
 - 19) Shapiro ED, Austrian R. Serotypes responsible for invasive Streptococcus pneumoniae infections among children in Connecticut. J Infect Dis 1994;169:212-4.
 - 20) Choi KM, Kim JH, Shin KM, Yeon SI, Shin JS, Yong DE, et al. Serotypes and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*. Korean J Pediatr Infect Dis 2003;10: 159-66.
 - 21) Pai R, Moore MR, Pilishvili T, Gertz RE, Whitney CG, Beall B. Active Bacterial Core Surveillance Team. Post-vaccine genetic structure of Streptococcus pneumoniae serotype 19A from children in the United States. J Infect Dis 2005;192: 1988-95.
 - 22) Kim KH, Lee JE, Whang IT, Ryu KH, Hong YM, Kim GH, et al. Serogroup and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolated from oropharynx in children attending day care center. J Korean Pediatr Soc 2002;45: 346-53.
 - 23) Hansman D, Morris S, Gregory M, McDonald B. Pneumococcal carriage amongst Australian aborigines in Alice Springs, Northern Territory. J Hyg(Lnd) 1985;95:677-84.
 - 24) Gratten M, Montgomery J, Gerega G, Gratten H, Siwi H, Poli A, et al. Multiple colonization of the upper respiratory tract of Papua New Guinea children with Haemophilus influenzae and *Streptococcus pneumoniae*. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1989;20:501-9.
 - 25) Huebner RE, Dagan R, Porath N, Wasas AD, Klugman KP. Lack of utility of serotyping multiple colonies for detection of simultaneous nasopharyngeal carriage of different pneumococcal serotypes. Pediatr Infect Dis J 2000;19: 1017-20.
 - 26) Bronsdon MA, O'Brien KL, Facklam RR, Whitney CG, Schwartz B, Carlone GM. Immunoblot method to detect *Streptococcus pneumoniae* and identify multiple serotypes from nasopharyngeal secretions. J Clin Microbiol 2004;42: 1596-600.
 - 27) 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.
 - 28) Shutt CK, Samore M, Carroll KC. Comparison of the denka seiken slide agglutination method to the quellung test for serogrouping of Streptococcus pneumoniae isolates. J Clin Microbiol 2004;42:1274-6.
 - 29) 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.