

소아에서 multiplex RT-PCR에 의한 인후부 상주균 검출

충남대학교 의학전문대학원 소아과학교실

신지혜 · 한혜영 · 김선영

= Abstract =

Detection of nasopharyngeal carriage in children by multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Ji Hye Shin, M.D., Hye Young Han, M.D. and Sun Young Kim, M.D., Ph.D.

Department of Pediatrics, School of Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Korea

Purpose: The aim of this study was to determine the prevalence of asymptomatic nasopharyngeal carriage in children using a multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction (mRT-PCR) assay kit.

Methods: We obtained nasopharyngeal swabs from 33 children without any underlying disease from July 25 to July 28, 2008. The children were free from the signs of respiratory tract infections at the time of sampling. DNA was extracted from the swabs and subjected to multiplex RT-PCR using a primer set for the detection of pneumococci (Seeplex[®] PneumoBacter ACE Detection Seegene, Seoul, Korea). The amplified PCR products were separated on 2% agarose gels and stained with either ethidium bromide or screen tape system (Lab901 Scotland, UK).

Results: A total of 33 children (male, 15 female, 18) aged between 3.2 and 16.3 (median, 8.2) years were included in this study. The mRT-PCR detected colonized bacteria (*Streptococcus pneumoniae*, *Hemophilus influenzae*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Bordetella pertussis*) in 30 children (90.9%). Of these, 13 children (39.4%) showed more than 2 bacteria: 12 children were positive for 2 bacteria (*S. pneumoniae* and *H. influenzae*) and 1 child was positive for 3 bacteria (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, and *C. pneumoniae*).

Conclusion: mRT-PCR was found to be a sensitive tool for the detection of asymptomatic nasopharyngeal carriage. Clinical significances of the bacteria detected by mRT-PCR will have to be evaluated in the future. (Korean J Pediatr 2009; 52:1358-1363)

Key Words: Nasopharynx, *Streptococcus pneumoniae*, *Hemophilus influenzae*, Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

서 론

비인두는 여러 가지 잠재적 호흡기 감염균의 상주 장소로서 상주균에 의한 증상은 대부분 무증상이지만 간혹 주위조직으로 침범하여 중이염 및 폐렴 등을 유발할 수 있고 드물게는 폐혈증이거나 수막염 같은 침습적 감염을 일으킬 수도 있다¹⁻³⁾. 특히 면역능력이 저하된 환아들에서는 피부와 점막의 방어벽이 약하여상주균이 병원균이 될 수 있는 가능성이 더 높아지며, 단시간에 심각한

한 폐렴 및 폐혈증으로 진행할 수 있어 주의를 요하게 된다⁴⁾.

호흡기 감염균 검출을 위한 방법으로는 효소면역법(enzyme immunoassay)과 면역형광항체법(immunofluorescent antibody test), 그리고 비인두 흡인을 통한 균 배양법이 그동안 많이 사용되어 왔었다^{5, 6)}. 그러나 효소면역법은 민감도가 낮으며, 면역형광항체법은 민감도가 좋고 감별할 수 있는 종이 더 많기는 하지만 숙련된 실험자와 장비를 필요로 하는 제한점이 있으며, 균 배양법은 많은 시간을 필요로 하는 단점이 있다^{5, 6)}. 반면 한 번에 여러 병원균을 동시에 검사할 수 있는 장점이 있는 다중역전사중합효소연쇄반응법(multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction; mRT-PCR)은 민감도와 특이도가 높아 그 효용성이 점차 인정받고 있는 실정이다⁷⁻⁹⁾.

저자들은 정상 소아들을 대상으로 비인두 분비물을 채취하여 6가지 호흡기 병원균에 대한 mRT-PCR을 시행하고 호흡기 감염의 증상이 없는 정상 소아에서 인후부 상주균의 분포를 알아보고

Received : 23 July 2009, Revised : 11 September 2009

Accepted : 3 October 2009

Address for correspondence : Sun Young Kim, M.D., Ph.D.
Department of Pediatrics, College of Medicine, Chungnam National University, 33, Munwha-ro, Jung-gu, Daejeon, 301-721 Korea
Tel : +82.42-280-7252, Fax : +82.42-255-3158
E-mail : nel1205@hanmail.net

자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

충남대학교병원 소아청소년과에 2008년 7월 25일부터 28일까지 내원한 정상 소아 33명을 대상으로 부모들의 동의 하에 검사를 진행하였으며 연구에 포함된 소아들은 서로 연관성이 없었다. 비인두 분비물 채취 당시 발열은 없었고 심각한 호흡기 감염의 증상도 없었다.

2. 방 법

1) Deoxyribonucleic acid (DNA) 분리

평균 면봉을 사용하여 비점막에서 비인두 분비물을 채취한 후 검체의 1.2 mL를 1.5 mL microcentrifuge tube에 옮겨 13,000 rpm에서 2-5분 동안 원심 분리한 후 침전물을 포함한 300 μ L를 DNA/Ribo-Nucleic Acid (RNA) Extraction Kit (Intron, Seoul, Korea)를 사용하여 RNA를 분리한 후 역전사 방법으로 complementary DNA (cDNA)를 얻었다.

2) Multiplex RT-PCR

추출한 cDNA를 사용하여 호흡기 병원균을 검사할 수 있는 multiplex primer set (Seeplex[®] PneumoBacter ACE Detection, Seegene, Seoul, Korea)로 PCR을 진행하였다. Multiplex primer set는 6종의 폐렴균 (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae*, *Bordetella pertussis*)을 동시에 검출할 수 있는 제품이다. PCR 반응액은 3 μ L의 cDNA, 4 μ L의 5 \times PB ACE PM, 3 μ L의 8-MOP solution, 10 μ L의 2 Multiplex Master Mix로 총 20 μ L가 되도록 하였다. PCR은 94 $^{\circ}$ C에서 15분 반응 후, 94 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 1.5분, and 72 $^{\circ}$ C 1.5분의 반응을 40회 반복하였고, 최종적인 연장 반응을 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 실시하였다. 증폭된 반응산물은 재현성을 위해 2% agarose gel과 screen tape system (Lab901, Scotland, UK)에 동시에 전기 영동하여 그 결과를 비교하였는데 screen tape system은 8개의 검체를 동시에 전기 영동할 수 있으며 10분 안에 결과를 컴퓨터 화면에 보여 줄 수 있는 자동화 시스템이다.

결 과

1. 대상 소아들의 특성

남아가 15명(45.5%), 여아가 18명(54.5%)이었으며 연령의 중앙값은 8.2 (3.2-16.3)세였다. 발열이 있었던 소아는 없었으며 13명(39.4%)에서는 투약을 필요로 하지 않는 간헐적 기침과 콧물이 있었으나 다른 소아들은 무증상이었다(Table 1).

2. mRT-PCR 결과

전체 90.9% (30/33)의 양성률을 보였으며, 단일균 양성인 경우가 51.5% (17/33), 두 종류의 균이 양성되었던 경우는 36.4% (12/33), 세 종류의 균이 양성되었던 환아는 3% (1/33)였다. 30명의 양성 소아들에서 총 4종(*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *C. pneumoniae*, *B. pertussis*)의 균이 검출되었다. 이들 중 *H. influenzae*가 가장 많아서 28명(84.8%)에서 양성으로 나왔으며, *S. pneumoniae*가 13명(39.4%), *B. pertussis*와 *C. pneumoniae*가 각각 1명(3.0%)씩 있었다(Fig. 1). 특이한 소견은 *S. pneumoniae*가 단독으로 검출된 소아는 한 명도 없었으나 *H. influenzae*는 15명(45.5%)에서 단독으로 검출되었다. 12명(36.4%)에서 *S. pneumoniae*와 *H. influenzae*가 동시에 검출되었는데 이들 중 한 명은 2% agarose gel에서는 *S. pneumoniae*가 확실하게 보였지만 screen tape system에서는 약하게 나타났다(No. 13). 한 명(3.0%)에서는 *S. pneumoniae*, *H. influenzae*와 *C. pneumoniae*가 동시에 검출되었는데 이 소아의 연령은 3.2세였으며 검체 채취 당시 호흡기 감염의 증상은 없었다(No. 32). 한 명(3.0%)에서 *B. pertussis*가 검출되었는데, 이 소아는 10.5세였으며 호흡기 감염의 증상은 없었고 동생이 급성림프구성 백혈병으로 항암화학요법 중이었다. 이 소아의 동생에서 mRT-PCR을 시행한 결과 *B. pertussis*가 양성이었으며 동생은 검체 채취 한 달 이내에 밤에 심해지는 기침이 있어 입원했던 병력이 있었다(No. 30). 결과의 재현성을 위해 2% agarose gel과 screen tape system에서 동시에 전기 영동을 하여 비교한 결과 한 명(No. 13)을 제외하고 모두 같은 결과를 보였는데, screen tape system에서 검출하지 못한 *S. pneumoniae*는 2% agarose gel에서도 아주 희미하게 보였다(Fig. 2).

Table 1. Clinical Characteristics of the Children

Variables	Cases (n=33)
Age (years), median (range)	8.0 (3.0-16.0)
Sex (n)	
Male/Female	15/18
Symptoms, n (%)	
Cough with rhinorrhea	13 (39.4%)
Fever	0 (0.0%)

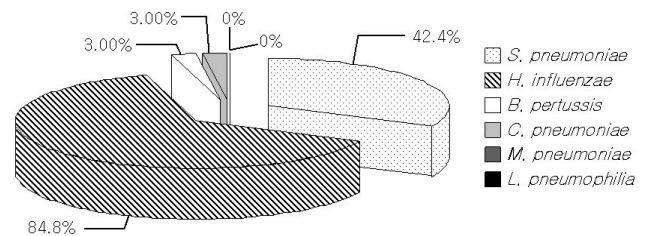


Fig. 1. Distribution of nasopharyngeal carriage.

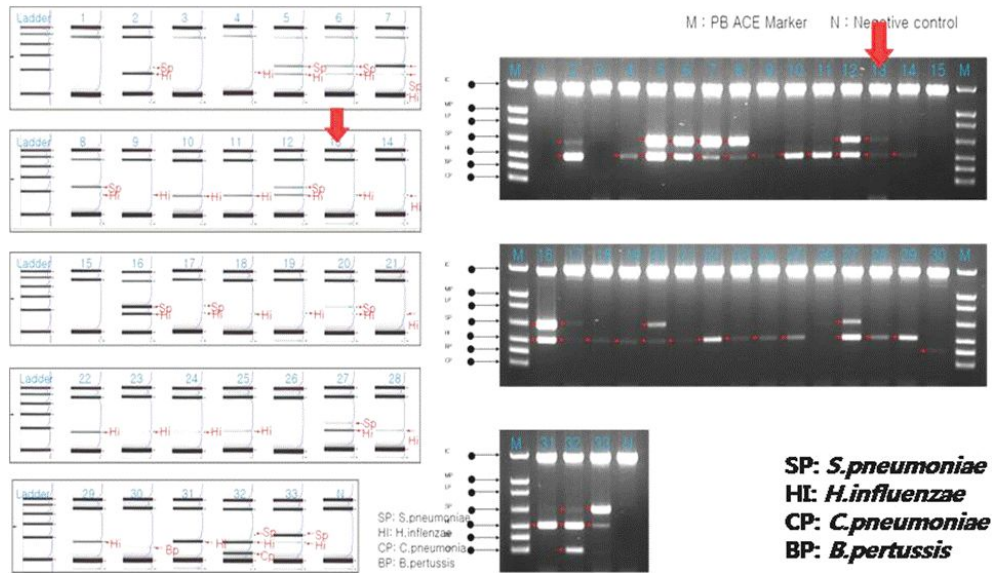


Fig. 2. The results of screen tape system (A) and 2% agarose gel electrophoresis (B) after multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction (mRT-PCR). mRT-PCR detected bacteria in 30 children (90.9%). Of them, 13 (39.4%) showed more than 2 bacteria: 12 children were positive for 2 bacteria (*Streptococcus pneumoniae* and *Hemophilus influenzae*) and 1 child was positive for 3 bacteria (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, and *Chlamydia pneumoniae*). In 1 child (No. 13), *S. pneumoniae* was not detected on the screen tape system but was detected by the 2% agarose gel electrophoresis (arrow).

고 찰

비인두는 여러 가지 잠재적 호흡기 감염균의 상주 장소로서 *S. pneumoniae* 및 *H. influenzae* 등이 대표적인 예이다^{1, 2)}. 인후부 상주균에 대한 검사는 환자에서 발생한 호흡기 감염의 경과 및 예후를 예측하고 불필요한 항생제 사용을 피할 수 있도록 도움을 줄 수 있을 것이며, 나아가 그 지역사회에서 역학조사 및 백신의 개발로 예방 대책을 수립하도록 기초 자료를 제공한다는 데 그 의의가 있다고 할 수 있겠다.

*S. pneumoniae*는 대표적인 인후부 상주균으로 성인의 5-10%, 소아에서는 25-50%의 보균율이 알려져 있다¹⁰⁾. *S. pneumoniae*의 보균율의 정도는 연령, 인종 등 대상에 따라 많은 차이가 있으며 단체 생활을 하는 어린 소아에서 가장 높다¹¹⁾. 특히 유아원에 있는 어린이의 경우 *S. pneumoniae* 보균율이 높을 뿐만 아니라 폐니실린 내성 *S. pneumoniae*의 보균율도 높다고 알려져 있다¹¹⁾. 건강한 소아의 *S. pneumoniae* 인후부 보균율은 검체 채취 방법, 대상 소아의 연령, 형제 관계와 단체 생활 여부 등과 관련이 있다. 국내에서는 병원에 내원한 환아를 대상으로 9-10월에 비인두 검체에서 시행한 연구 결과 보균율이 19.8%로 나타났다¹²⁾, 유치원 어린이를 대상으로 4월에 구인두 검체에서 시행한 연구에서는 보균율이 38%로 대상 어린이와 계절에 따라 보균율에 차이를 보였다^{12, 13)}. 본 연구 결과는 7월에 시행하였으며 39.4%에서 양성으로 나와 이전의 연구들과 유사한 보균율을 보

이고 있었다.

S. pneumoniae 백신 사용은 그 보균율을 낮출 수 있는 요인으로 생각해 볼 수 있는데 국내의 경우 *S. pneumoniae*의 다당질과 운반체 단백을 결합시킨 7가 다당질 단백질백신이 개발되어 2003년부터 접종이 이루어지고 있다¹⁴⁾. 이로 인해 폐니실린 내성 *S. pneumoniae*의 비인두 보균율을 감소시키고, 백신을 접종한 소아들이 늘면서 접종을 하지 않은 소아에게까지도 보균율을 감소시키는 효과를 기대해 볼 수 있게 되었다^{14, 15)}. 미국의 경우 실제로 7가 백신 사용 이후 *S. pneumoniae*의 침습적 감염율이 1998년 100,000명당 24.3명에서 2001년에는 17.3명으로 감소하였는데 이는 좋은 예가 될 수 있을 것이다¹⁵⁾. 본 연구의 대상 소아들 중 7가 백신을 접종 받은 환아들은 12명(36.4%)였는데 이들 중 2명(16.7%)만이 *S. pneumoniae*가 양성으로 나와 향후 연구 결과에서는 그 보균율이 감소하리라 기대해본다.

본 연구 결과 *H. influenzae* 양성율이 84.8%로 가장 많은 빈도를 차지하는 인후부 상주균으로 나타났다¹⁶⁾. *H. influenzae*의 보균율을 조사한 최근의 한 연구결과 전체적으로는 32.4%, b형이 7.2%, 다른 피막화된 또는 피막화되지 않은 형태는 7.6%이며, 6-7세 사이의 소아에서 36.2%로 가장 보균율이 높다고 보고한 바 있다¹⁶⁾. 본 연구 결과 *H. influenzae* 양성율이 매우 높게 나타났는데 이는 아마도 연령과 지역적, 계절적인 차이, 예방접종 여부를 고려해야겠지만 그 보다 방법적인 면에서 mRT-PCR의 민감도가 높았을 것이라는 점도 간과할 수 없을 것이다.

H. influenzae 백신은 2개월부터 접종을 시작한 이후 5세 이

하 소아에서 *H. influenzae* b로 인한 질병이 현저하게 감소하면서 그 효과를 입증하게 되어 영아에서 백신의 사용이 입증받게 되었다¹⁷⁾. 본 연구의 환아들은 모두백신을 접종한 과거력이 있었으며 따라서 백신과 연관이 없는 *H. influenzae* 아형의 집락화를 고려해야 할 것이다. 그렇다면 병원균으로써 관심 여부에 대해서는 재고의 여지가 있을 수 있을 것 같다.

*C. pneumoniae*는 소아나 성인에서 기관지염, 폐렴 등을 일으키며 비말 감염을 통하여 전파된다¹⁸⁾. *C. pneumoniae*의 보균율에 대해서는 드물기 때문에 정확히 알려진 바가 없으며 본 연구에서도 단 한 명(3.0%)에서 만이 양성으로 나타났다.

*B. pertussis*의 정확한 조기 진단은 급성기 환자의 치료 면에서 뿐 아니라 환자와의 접촉자를 예방적으로 치료하여 질병의 발생을 미리방지하기 위해서도 매우 중요하다¹⁹⁻²¹⁾. 그러나 전형적 증상은 감염되고 나서 3주 이후에 시작되므로 조기 진단이 어렵고 모든 증례에서 *B. pertussis*의 특이적인 증상이 나타나는 것은 아니므로 진단이 어렵다²⁰⁾. 확진을 위한 검사법 중 배양검사는 특이도가 높은 반면 적어도 약 3-6일의 시간이 필요하고 질병 초기에 검체를 채취하기가 어려우며 항생제 치료를 한 경우에는 배양률이 저하되어 민감도가 낮다는 단점도 있다^{22, 23)}. 이에 반해 PCR 검사법은 비특이적 양상을 보이는 무증상 환자의 조기 발견을 통한 균의 확산방지, 역학조사, 백신 효율의 평가에 유용하다^{22, 23)}. *B. pertussis*의 배양검사와 PCR의 결과를 비교한 연구 결과에 의하면 PCR의 민감도는 97%인 반면 배양검사는 58%에 불과했고 특이도는 PCR이 93%, 배양검사는 100%로 보고된 바 있다²³⁾. 본 연구에서 *B. pertussis*가 검출된 1명의 소아는 무증상 감염자로 생각되며 민감도가 높은 PCR 방법을 이용하였으므로 검출이 가능하였다고 생각된다. 그러므로 세기관지염, 폐렴, 기관지염으로 진단된 환아들에서 *B. pertussis*에 대한 PCR 검사를 시행해 본다면 적지 않은 수의 이환 환아들이 있을 것으로 추측된다²⁰⁾.

호흡기 감염균의 감별을 위해서는 효소면역법과 면역형광항체법 그리고 균 배양법이 그 동안 많이 사용되어 왔었다. 그러나 최근에는 한 번에 여러 병원균을 동시에 검사할 수 있는 장점이 있는 mRT-PCR가 민감도와 특이도가 높아 이에 대한 연구들이 진행되고 있다⁷⁻⁹⁾. 본 연구에서 사용한 multiplex primer set는 소량의 검체를 이용하여 동시에 6가지 균을 검사할 수 있고, 민감도와 특이도가 모두 높으며, 결과 해석이 용이하다는 장점이 있다. 그러나 단점으로는 항생제 내성 검사를 시행할 수 없고, 10^3 /mL 미만에서 검출되는 균에 대한 해석이 어렵다는 것이다. 기존의 보고에서 mRT-PCR의 특이도는 배양검사와 면역형광항체법을 기준으로 96-99%, 단일 RT-PCR을 기준으로 96-100%로 특이도는 매우 우수하였으며, 검출 한계값이 10 copies/mL로 기존의 다른 검사법들의 검출한계 값인 50-250 copies/mL에 비해 민감도 역시 우수하다고 한다^{24, 25)}. mRT-PCR이 민감도가 높을 수 있는 이유로는 면역형광항체법이나 배양검사가 검체의 종류, 채취 시간, 검체의 질, 운송조건, 동정에 사용하는 시

약 등에 따라 영향을 많이 받는 것에 비해 mRT-PCR은 이러한 영향을 덜 받기 때문으로 생각된다⁷⁻⁹⁾.

본 연구에서는 비인두 면봉채취법으로 검체를 채취하게 되었는데 채취 방법에 따른 결과의 차이를 고려해야 한다. Ahluwalia 등²⁶⁾은 Respiratory syncytial virus (RSV) 검출 연구에서 사용한 비인두 흡인물이 면봉채취법에 의해 채취된 검체에 비해 민감도가 10% 높은 것으로 보고 하였다. RSV를 대상으로 한 Kim 등²⁷⁾의 연구에서도 비인두 흡인물이 면봉채취법에 의한 검체에 비해 RT-PCR 결과가 약 20% 높게 나타났다. 본 연구에서는 무증상의 소아를 대상으로 하였기 때문에 콧물의 증상이 없어서 검체의 비인두 흡인물 채취가 어려워 면봉채취법으로 검체를 채취하게 되었는데 결과를 해석할 때 채취 방법에 따른 차이를 고려해야 할 것으로 생각된다.

Screen tape system은 간편하고, 빠르며 정확하게 DNA 전기영동을 하기 위해 고안된 장치이다. 특히 젤을 제작하는 과정에서 필수적인 ethidium bromide라는 발암 물질을 취급하지 않아도 되며, 젤의 농도에 따른 결과의 상이함 등을 최소화 시킬과 동시에 컴퓨터를 통한파일 관리를 통해 정도 관리에도 유용함을 제공한다. 이 장치는 8개의 검체를 한 번에 검사하며 10분 만에 컴퓨터를 통해 결과값을 보여주기 때문에 간편하며, 누구나 검사가 가능한 쉬운 소프트웨어를 가지고 있고, 작고 가벼운 구조로 검사실 공간의 효율적 사용이 가능하다. 결과도 2% agarose gel과 비교 시 별 차이가 없어 향후 편리하게 사용할 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 2% agarose gel과 screen tape system에서 동시에 전기영동을 하여 비교한 결과 한 명(No. 13)을 제외하고 모두 같은 결과를 보였는데, screen tape system에서 검출하지 못한 *S. pneumoniae*는 2% agarose gel에서도 아주 희미하게 보였으며 아마도 이는 cDNA 양이 부족했었을 것으로 생각된다(Fig. 2).

mRT-PCR을 이용하여 무증상 소아들에서 비인두 상주균에 대한 검사를 시행한 본 연구에는 몇 가지 제한점들이 있는데 그 대표적 예가 검출된 균들의 해석이다. 각각의 아형에 대한 검사가 포함되어 있지 않으므로 병원균으로 간주해야 할 지에 대해 재고의 여지가 있으며 항생제 내성 검사를 할 수 없기 때문에 항생제 선택에 결정적인 도움은 될 수 없다는 점이다. 또한 상기도 상재균의 분포에 대한 연구이지만, 대상의 연령층 범위가 매우 넓은 반면에 대상 소아 수가 적어 상재균의 분포에 대한 대표적인 자료로 보기에는 제한점이 있다. 그리고 마지막으로 가장 나이가 어린 소아의 연령이 3.2세로 *S. pneumoniae*와 *H. influenzae*의 보균율은 상대적으로 3세 미만에서 높는데 이 소아들이 포함되어 있지 않았다는 점도 본 연구의 제한점이 될 수 있을 것이다. 그러나 mRT-PCR은 비인두 상주균의 동정에 있어서 빠른 시간 내에 결과를 알 수 있고 민감도가 높은 방법으로 생각되며 앞으로 비인두 상주균에 대한 mRT-PCR 결과가 소아들의 임상양상과 어느 정도 일치할지에 대해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

목적: 호흡기 감염의 증상이 없는 소아들을 대상으로 다중 역전사중합효소연쇄반응법(multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction; mRT-PCR)을 이용하여 비인두 상주균의 이환율을 알아보고자 하였다.

방법: 2008년 7월 25일부터 28일까지 33명의 소아들을 대상으로 비강 면봉채취법으로 검체를 채취하였으며, 이들은 검체 채취 당시 심각한 호흡기 감염의 증상이 없었다. 모아진 검체에서 DNA를 추출한 후 multiplex primer set (Seeplex® PneumoBacter ACE Detection, Seegene, Seoul, Korea)로 PCR을 진행하였다. 증폭된 반응산물은 2% agarose gel과 전기 영동 자동화 시스템인 screen tape system (Lab901, Scotland, UK)에 각각 전기 영동하여 확인하였다.

결과: 전체 33명의 소아 중 남자는 15명 여자는 18명이었으며, 나이는 3.2세에서 16.3세로 중앙값은 8.2세였다. mRT-PCR 결과 30명(90.9%)의 소아들에서 양성을 보였으며(*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *C. pneumoniae*, *B. pertussis*), 이들 중 13명(39.4%)에서 2가지 이상의 균이 검출되었다. 균의 종류로는 12명(36.4%)에서는 *S. pneumoniae*와 *H. influenzae*, 1명(3.0%)에서는 *S. pneumoniae*, *H. influenzae*와 *C. pneumoniae*이 검출되었다.

결론: mRT-PCR은 비인두 상주균의 동정에 있어서 민감도가 높은 방법으로 생각된다. 하지만 비인두 상주균에 대한 PCR 결과가 소아들의 임상 양상과 어느 정도 일치할지에 대해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

References

- 1) Denny FW, Clyde WA. Acute lower respiratory tract infections in nonhospitalized children. *J Pediatr* 1986;108:635-46.
- 2) Neto AS, Lavado P, Flores P, Dias R, Pessanha MA, Sousa E, et al. Risk factors for the nasopharyngeal carriage of respiratory pathogens by Portuguese children: phenotype and antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist* 2003;9:99-108.
- 3) Marchisio P, Esposito S, Schito GC, Marchese A, Cavagna R, Principi N. Hercules Project Collaborative Group. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children: implications for the use of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. *Emerg Infect Dis* 2002;8:479-84.
- 4) Ljungman P, Engelhard D, de la Cámara R, Einsele H, Locasciulli A, Martino R, et al. Vaccination of stem cell transplant recipients: recommendations of the Infectious Diseases Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant* 2005;35:737-46.
- 5) Ebihara T, Endo R, Ma X, Ishiguro N, Kikuta H. Detection of human metapneumovirus antigens in nasopharyngeal secretions by an immunofluorescent-antibody test. *J Clin Microbiol* 2005;43:1138-41.
- 6) Kukavica-Ibrulj I, Boivin G. Detection of human metapneumovirus antigens in nasopharyngeal aspirates using an enzyme immunoassay. *J Clin Virol* 2009;44:88-90.
- 7) Gruteke P, Glas AS, Dierdorp M, Vreede WB, Pilon JW, Bruisten SM. Practical implementation of a multiplex PCR for acute respiratory tract infections in children. *J Clin Microbiol* 2004;42:5596-603.
- 8) Freymuth F, Vabret A, Cuvillon-Nimal D, Simon S, Dina J, Legrand L, et al. Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnosis of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness. *J Med Virol* 2006;78:1498-504.
- 9) Mahony J, Chong S, Merante F, Yaghoubian S, Sinha T, Lisle C, et al. Development of a respiratory virus panel test for detection of twenty human respiratory viruses by use of multiplex PCR and a fluid microbead-based assay. *J Clin Microbiol* 2007;45:2965-70.
- 10) Ralph DF, James DC. Textbook of pediatric infectious diseases. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1998:1129-36.
- 11) 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. *Korean J Pediatr* 2002;45:346-53.
- 12) Song JH, Jin JH, Yang JW, Lee H, Kim SW, Peck KR, et al. High rate of nasopharyngeal colonization of penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* among Korean children. Program and abstract of 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Diego, American Society for Microbiology, 1998.
- 13) Kim YK, Lee CK. Oropharyngeal carriage and antimicrobial resistance of *S. pneumoniae* in children of Seoul. *Korean J Pediatr Infect Dis* 1997;4:218-24.
- 14) Dagan R. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on infections caused by antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatric Infectious Disease Unit, Soroka University Medical Center, Ben-Gurion University of the Negev, Beer-Sheva, Israel. Clinical microbiol infection* 2009;15Suppl 3:16-20.
- 15) Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Lynfield R, et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N Eng J Med* 2003;348:1737-46.
- 16) Torun MM, Namal N, Demirci M, Bahar H. Nasopharyngeal carriage and antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* in healthy school children in Turkey. *Indian J Med Microbiol* 2009;27:86-8.
- 17) Zepp F, Schuind A, Meyer C, Sanger R, Kaufhold A, Willems P. Safety and reactogenicity of a novel DTPa-HBV-IPV combined vaccine given along with commercial Hib vaccines in comparison with separate concomitant administration of DTPa, Hib, and OPV vaccines in infants. *Pediatrics* 2002;109:e58.
- 18) Kim KW, Kim KE. Mycoplasma and chlamydia infection in Korea. *Korean J Pediatr* 2009;52:277-82.
- 19) Leung AK, Robson WL, Davies HD. Pertussis in adolescents. *Adv Ther* 2007;24:353-61.
- 20) Cagney M, MacIntyre CR, McIntyre P, Torvaldsen S, Melot V. Cough symptoms in children aged 5-14 years in Sydney,

- Australia: non-specific cough or unrecognized pertussis? *Respirology* 2005;10:359-64.
- 21) Tan T, Halperin S, Cherry JD, Edwards K, Englund JA, Glezen P, et al. Pertussis immunization in the global pertussis initiative North American region: recommended strategies and implementation considerations. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24(5 Suppl):S83-6.
 - 22) Dragsted DM, Dohn B, Madsen J, Jensen JS. Comparison of culture and PCR for detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* under routine laboratory conditions. *J Med Microbiol* 2004;53:749-54.
 - 23) André P, Caro V, Njamkepo E, Wendelboe AM, Van Rie A, Guiso N. Comparison of serological and real-time PCR assays to diagnose *Bordetella pertussis* infection in 2007. *J Clin Microbiol* 2008;46:1672-7.
 - 24) Sung H, Park SJ, Woo YD, Choi BH, Kim MN. Evaluation of Seeplex RV detection kit for detecting rhinovirus, human metapneumovirus, and coronavirus. *Korean J Lab Med* 2008;28:109-17.
 - 25) Leland DS, Ginocchio CC. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:49-78.
 - 26) Ahluwalia G, Embree J, McNicol P, Law B, Hammond GW. Comparison of nasopharyngeal aspirate and nasopharyngeal swab specimens for respiratory syncytial virus diagnosis by cell culture, indirect immunofluorescence assay, and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1987;25:763-7.
 - 27) Kim HS, Kim HL, Park KH, Cho KS. Clinical usefulness of rapid antigen test to detect respiratory syncytial virus infection. *Korean J Pediatr* 2008;51:1071-6.