

다중구슬 폐구균 혈청형 분석법의 국내 확립과 적용 연구

김한울^{1,2} · 이소영^{1,2} · 이미애³ · 김경호^{1,2}

이화여자대학교 의과대학 소아과학교실¹, 이화여자대학교 의과대학연구소 백신효능연구센터², 이화여자대학교 의과대학 진단검사의학과³

Establishment and Application of a Multibead Serotyping Assay for Pneumococci in Korea

Han Wool Kim^{1,2}, Soyoung Lee^{1,2}, Miae Lee³, Kyung-Hyo Kim^{1,2}

¹Department of Pediatrics, ²Center for Vaccine Evaluation and Study, Ewha Medical Research Institute, and ³Department of Laboratory Medicine, Ewha Womans University School of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Serotyping pneumococcal isolates is important to monitor efficacy of pneumococcal vaccines. Because of difficulties of typing pneumococci, a multiplex bead-based (multibead) serotyping assay was recently introduced. The aim of this study is to establish a new multibead serotyping assay and to apply this method to analyze clinical isolates of pneumococci in Korea.

Methods: To establish the multibead serotyping assay, six key reagents were transferred from University of Alabama at Birmingham (UAB) to Ewha Center for Vaccine Evaluation and Study (ECVES): bead set coated with polysaccharide and monoclonal antibody pool were used in one multiplex inhibition-type immunoassay and 2 bead sets coated DNA probe and 2 primer pools were used in two multiplex PCR-based assays. After multibead serotyping assay was set up, 75 test samples of pneumococci were analyzed whether ECVES is able to identify serotype correctly. After confirming the performance, serotyping assay was applied to identify serotypes of 528 clinical isolates of pneumococci collected from 3 different hospitals.

Results: After establishment of the multibead pneumococcal serotyping assay system at ECVES, 75 test samples were analyzed. There was no discrepancy of serotypes of 75 test samples between the results assigned at UAB and those at ECVES. The serotypes of 528 pneumococci isolated from patients or healthy subjects were determined in 94.3% of isolates (498/528).

Conclusions: The multibead pneumococcal serotyping assay can be successfully established in Korea. With this method, surveillance of serotypes of pneumococci isolated from patients as well as healthy subjects could be studied.

Key Words: *Streptococcus pneumoniae*, Serotyping, Assay, Multibead

접수: 2015년 4월 9일

수정: 2015년 5월 11일

승인: 2015년 5월 19일

책임저자: 김경호

이화여자대학교 의과대학 소아과학교실

Tel: 02)2650-5700, Fax: 02)2650-2817

E-mail: kaykim@ewha.ac.kr

서론

폐구균(*Streptococcus pneumoniae*)은 중이염, 폐렴, 부비동염, 균혈증, 수막염 등의 질환을 일으키며 전 세계적으로 영아 및 어린 소아와 고령자에서 생명을 위협하는 중증 침습 질환의 주요 원인이다. 폐구균의 피막다당은 병독성의 가장 중요한 인자이며 항원성을 나타내고 이의 혈청학적 성질에 따라 94개의 혈청형이 현재까지 보고되고

있다¹⁻³⁾. 현재 침습 폐구균 감염을 예방하기 위해 다양한 폐구균 백신이 개발되어 사용되고 있으며 23가지 혈청형을 포함하고 있는 다당백신과 7-13개의 혈청형을 포함하고 있는 단백결합백신들이 있다.

이들 폐구균 백신은 대부분의 경우 혈청형 특이 면역을 유도하며 특히 폐구균 단백결합 백신이 사용된 이후 전 세계적으로 감염의 원인이 되는 폐구균 혈청형의 변화가 보고되고 있다. 즉 백신에 포함된 혈청형에 의한 질환은 감소하고 백신에 포함되지 않은 비백신 혈청형에 의한 폐구균 질환이 증가되었다⁴⁾. 이와 같이 폐구균 혈청형의 결정과 이를 통한 혈청형 변화 등의 감시는 결국 사용되는 백신의 효능 평가를 가능하게 하며 폐구균 감염의 원인 혈청형의 역학 변화에 대한 정보는 새로운 백신에 필요한 추가 혈청형에 대한 중요 자료가 될 수 있다.

폐구균 혈청형을 결정하기 위해 가장 고전적으로 사용된 Quellung 반응법은 균의 피막다당 항원에 특이 항체가 반응하는 경우 피막이 부풀어 오르는 것을 현미경으로 관찰하여 혈청형을 결정짓는 방법으로 가장 오래 전부터 사용된 매우 요긴한 검사법이다. 그러나 검사하는데 시간과 노력이 많이 소모되며 숙련된 검사자가 필요하고 검사 결과가 주관적이라는 단점이 있다⁵⁾. 그 밖에 피막다당에 대한 항체를 이용한 라텍스 응집반응법과 dot blot 법은 Quellung 반응법보다는 더 신속하나 여전히 검체 분석에 시간이 오래 걸린다⁶⁾. 이에 비해 폐구균 피막다당 합성 유전자를 증폭하여 혈청형 분석에 이용하는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 혈청형 분석법은 좀 더 자동화되고 편리하지만 혈청형 결정이 유전자 수준의 확인법이어서 실제 발현되는 표현형과 차이가 날 수 있다는 단점이 있다^{7,8)}. 2005년 Nahm 등⁹⁾은 단클론항체와 PCR 산물이 코팅된 라텍스 구슬을 사용하여 흐름세포측정기(flow cytometry)를 이용한 혈청형 분석법을 개발하여 보고하였다^{10,11)}. 이 새로운 분석법은 많은 수의 검체를 빠른 시간 내에 정확하고 객관적으로 분석할 수 있는 장점을 보여주었다.

본 연구에서는 Jigui 등¹⁰⁾이 개발, 보고한 혈청형 분석법인 다중구슬(multibead) 혈청형 분석법을 본 연구소에 구축하고 실제 임상 검체에서 분리된 폐구균의 혈청형 분석에 도입하여 그 결과를 보고하는 바이다.

대상 및 방법

1. 세균

본 연구에서는 University of Alabama at Birmingham (UAB)의 Dr. Nahm으로부터 고전적인 방법을 포함한 다양한 방법을 통해 혈청형이 결정된 폐구균 75개 균주(반응 A 확인을 위한 28개, 반응 B 확인을 위한 22개, 반응 C 확인을 위한 25개)를 암호화하여 받았다. 이는 본 연구실에 수립된 다중구슬 혈청형 분석법의 정확도를 확인하는데 사용하였다. 국내 3개 대학병원에서 수집한 528개의 폐구균 균주는 다양한 임상 검체에서 분리된 것으로 건강한 사람 혹은 중이염 환자의 비인두에서 수집한 검체 각각 140개 균주와 166개 균주 및 침습 감염환자에서 분리된 222개 균주가 포함되었고, 본 연구의 임상 검체 분석의 적용에 사용하였다.

2. 시약

다중구슬 혈청형 분석법에 사용되는 시약은 모두 6가지의 시약 세트가 필요하다. 즉 단클론항체를 이용한 분석법에 사용하는 폐구균 피막다당 특이 단클론항체 혼합액, 피막다당이 코팅되어 있는 다중구슬 혼합액, PCR에 의해 얻어진 시동체 혼합액(primer pool) 2 종류 및 DNA 탐색자가 코팅된 다중구슬 2 종류이다. 이들 6가지 시약 세트는 모두 UAB에서 제공 받았다. 시약의 구성과 조제 방법에 대한 자세한 기술은 Yu 등¹⁰⁾이 발표한 내용에서 확인할 수 있다.

3. 다중구슬 혈청형 분석법

분석법 전체 개요는 다음과 같다. 분석에 사용할 폐구균 용해물을 제조하여 혈청형 피막다당이 코팅되어 있는 다중구슬과 함께 넣어 단클론항체로 경쟁적 결합을 이용하여 26개 혈청형에 대해 확인하였다. 그 후 폐구균 용해물을 이용해 wzy 유전자를 PCR으로 증폭한 후 혈청형 특이 wzy 유전자 탐색자(probe)가 코팅되어 있는 다중구슬을 이용하여 추가 혈청형을 확인하였다.

1) 폐구균 용해물(lysate) 제조

폐구균을 액체배지(Todd-Hewitt Broth with 0.001% bromocresol purple)에 배양한 후 세균 용해 버퍼액(lysis buffer; sodium deoxycholate, sodium dodecyl sulfate,

sodium azide, sodium citrate in distilled water)을 넣고 흔들어서 주었다. 폐구균이 용해되어 용해물이 투명해질 때까지 37°C에 정치하였다.

2) 단클론항체를 이용한 다중구슬 혈청형 분석(반응 A)
 각 혈청형 피막다당에 대한 단클론항체를 넣어 폐구균 용해물에 존재하는 피막다당과 다중구슬에 결합된 피막다당의 경쟁적 억제를 이용하여 혈청형을 결정하는 방법이다(Fig. 1A). 다중구슬에 붙어있는 피막다당은 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 11E, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F 등 26가지 혈청형으로 구성되어 있다.

먼저 10배, 30배 희석된 폐구균 용해물을 준비하였다. 96 well 판(plate)의 각 well에 세척 버퍼를 100 µL 넣어 96 well 판의 막(membrane)을 적신 후, 음압으로 well의 액체를 빨아내었다. well에 준비한 다중구슬 혼합액을 25 µL 넣었다. 음압 여과로 2번 세척한 후 남은 판 뒤의 용액을 제거하였다. 그리고 모든 well에 다중구슬 블로킹(blocking) 버퍼를 25 µL 넣었다. 그 후 희석된 샘플 혹은 control 용해물을 25 µL 넣었다. 그리고 단클론항체 혼합액을 넣었다. 이후 어두운 곳의 실온에서 흔들면서 30분 반응시켰다. 반응시키는 동안 phycoerythrin (PE)-접합 항 마우스 면역글로블린 2차 항체(BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, US) 30 µL를 블로킹 버퍼 6 mL에 넣고 200배 희석하였다. 30분 반응 후, 음압 여과를 이용하여 4번 세척 하였다. 마지막 세척 후, 희석된 2차 항체를 넣었다. 뚜껑을 덮고 어두운 곳의 실온에서 흔들면서 30분 반응시킨 후, 음압 여과를 이용하여 4번 세척하였다. 그 후 모든 well에 세척 버퍼 75 µL를 넣고 어두운 곳의 실온에서 2시간 후 Bio-Plex 200 analyzer (Bio-Rad, Hercules, CA, US)로 형광값을 얻었다.

3) *wzy* 다중 PCR을 이용한 다중구슬 혈청형 분석(반응 B, C)

폐구균 용해물에 존재하는 *wzy* 유전자는 PCR 시동체 혼합액을 섞어 증폭해서 생성된 결과물에 폐구균 혈청형에 특이한 탐색자(probe)가 결합되어 있는 다중구슬이 결합되어 분석된다(Fig. 1B). 시동체 혼합액은 시동체 혼합액 B, C 두 가지이고 다중구슬 혼합액도 다중구슬 혼합액 B, C 두 가지로 B 세트는 33가지 혈청형과 *cpsA*, *lytA*를, C세트는 35가지 혈청형과 무피막 폐구균을 알아낼 수 있다. 이 과정을 통해서 분석해 낼 수 있는 혈청형은 Table 1에 나타내었다.

다중 PCR은 단클론항체를 이용한 분석법에서 혈청형이 밝혀지지 않은 검체를 가지고 진행한다. 먼저 폐구균 용해물 5 µL와 20 µL의 PCR 혼합액으로 PCR을 하였다. PCR 혼합물의 조성은 990 µL의 2 X 시동체 혼합액, 증류수

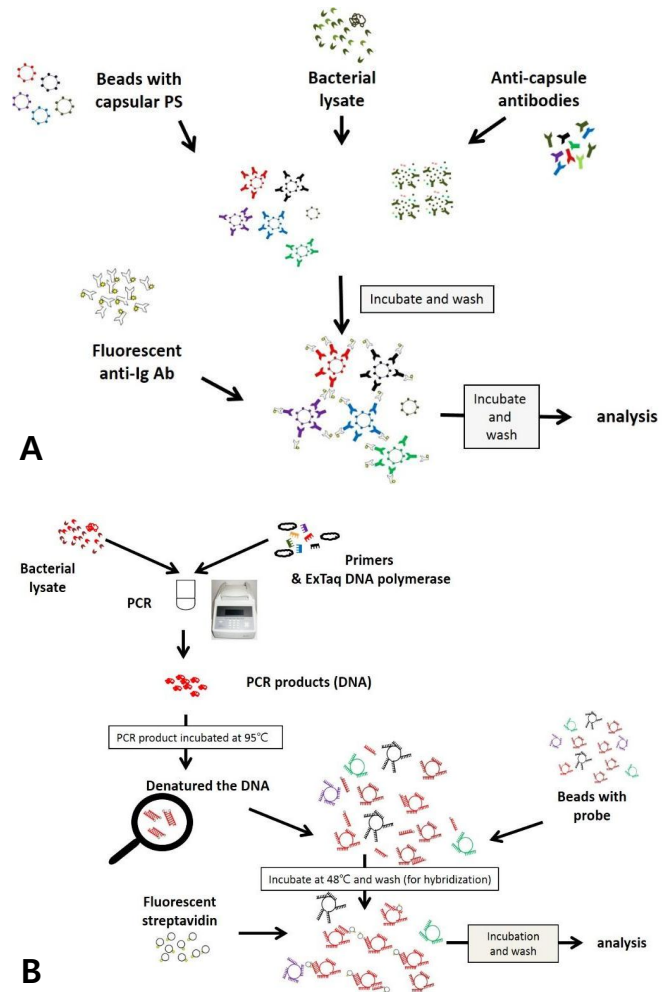


Fig. 1. Scheme of multibead serotyping assay procedure. (A) Multibead serotyping assay using monoclonal antibodies (Reaction A). In this assay, the bacterial lysates and a mixture of color-coded beads coupled to reference capsular polysaccharides (PSs) are incubated with a mixture of monoclonal antibodies that bind the immobilized capsular PSs. If a capsular PS is in the sample, the PS will inhibit the binding of the monoclonal antibody to the corresponding PS-coated bead. The amount of the monoclonal antibody bound to the beads is determined using a fluorescently labeled anti-mouse immunoglobulin secondary antibody. **(B) Multibead serotyping assay using *wzy* PCR (Reaction B and C).** The assay is designed to detect pneumococcal serotypes by identifying *wzy* gene. *wzy* from a pneumococcal lysate is PCR amplified with a mixture of PCR primers and the resulting PCR product is identified by hybridizing it to luminescence beads which are conjugated with a serotype specific probe.

Table 1. Bead Regions and Serotype Specificity in Reaction A, B and C

Reaction A		Reaction B		Reaction C	
Bead region	Analyte specificity	Bead region	Analyte specificity	Bead region	Analyte specificity
101	1	101	<i>lytA</i>	122	9N/9L
102	2	102	<i>cpsA1</i>	123	28A/28F
103	3	103	7B/7C/40	124	10C/10F
104	4	104	21	125	11B/11C
105	5	105	33A/33F/37	126	13
106	6A	106	15B/15C	127	24F/24A/24B
107	6B	107	16A	128	12A/12B/12F/44/46
108	6C/6D	108	16F	129	19B/19C
110	7F/7A	109	18A/18B/18C/18F	130	27
111	8	110	23A	131	32F/32A
112	9N	111	23B	132	15A/15F
113	9V/9A	112	25F/25A/38	133	33B/33D
114	10A/39	113	10A/10B	134	31
115	11A/11D/11F	114	43	135	41A/41F
116	11E/11A/11D/11F	115	36	136	29
117	12F	116	48	137	45
118	14	117	34	138	47A
119	15B/15C	118	35A/35C/42	139	33C
120	17F/17A	119	35F/47F	141	NCC2
121	18C	120	35B	142	NCC2 & NCC3
122	19A	140	6C/6D	143	NCC1
123	19F			144	<i>cpsA2</i>
124	20				
125	22F/22A				
126	23F				
127	33F/33A				

Abbreviation: NCC, null capsule clade.

990 µL, Ex Taq DNA 증합효소(Takara Bio, Madison, WI, US) 20 µL (100 U)이다. 각각의 시동체 혼합액은 250 µL의 Ex Taq 버퍼(Takara Bio, Madison, WI, US), 2.5 mM의 deoxynucleoside triphosphages (dNTP), 6.25 µL씩의 각각의 시동체¹⁰⁾로 이루어졌다. 온도순환기(thermal cycler)에 넣고 94°C 15분 후에 94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 1분을 35번 반복하였다. 그 후에 72°C의 확장시간을 가진 후 이렇게 얻어진 PCR 산물(amplicon)을 1:100으로 희석하여 96 well PCR 판으로 옮겨 담고 10분간 95°C에 둔다. DNA 탐색자가 결합되어 있는 다중구슬을 녹여 1 X tetramethylammonium chloride (TMAC) 버퍼(3M TMAC, 1 g/liter SDS, 50 mM Tris-HCl, 4 mM EDTA [pH 8.0])에 원심분리를 이용해 세척하였다. 그 후 4 mL의 1.5 X TMAC 버퍼에 풀어 48°C에 두었다가 40 µL씩 PCR 산

물이 있는 96 well 판에 넣어 섞어주고 어두운 곳에서 48°C에서 30분간 정치하였다. 그 후 1 X TMAC 버퍼 135 µL를 각 well에 추가한 후 전체 195 µL를 96 well PCR 판에서 96 well milipore 여과판(Millipore, Billerica, MA, US)으로 옮겼다. 음압 여과를 이용하여 실온에서 2회 씻어내고 1 X TMAC 버퍼로 세척 후 1 X PE-streptavidin (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, US)을 50 µL씩 well에 넣었다. 48°C에서 20분을 둔 후에 1 X TMAC, PBS-0.1% Tween 20으로 각각 세척을 한 후에 다시 80 µL의 PBS-0.1% Tween 20을 넣어준 후 Bio-Plex 200 analyzer로 분석하였다.

4. 다중구슬 혈청형 분석법의 유효성 확인

다중구슬 분석법이 효과적으로 구축이 되었는지 평가하기 위해 혈청형이 이미 정해진 폐구균을 UAB에서 받아 분석하였다. 각 폐구균은 코드화하여 표시된 상태로 본 연구진에게 전달되었고 혈청형을 분석하여 다시 UAB로 보내어 대조하였다. 정확도는 본 기관에서 분석된 혈청형과 원래 확인된 혈청형의 일치율로 나타내었다. 특이도는 해당 혈청형 외에 다른 혈청형에 대한 반응이 구별되는지 보기 위해 한 혈청형의 분석시 다른 혈청형의 값들을 함께 그래프에 나타내 비교해 보았다.

5. 다중구슬 혈청형 분석법의 국내 분리 폐구균 분석 적용

본 연구실에 확립된 다중구슬 혈청형 분석법을 실제 임상 검체에 적용해 보기 위하여 국내 분리 폐구균 528종을 다중구슬 혈청형 분석법으로 분석해보았다. 528종의 폐구균의 용해물을 제조한 후 반응 A를 먼저 진행하여 혈청형 분석을 하였다. 그 후 혈청형이 확인되지 않은 검체는 반응 B, C를 이용하여 추가 분석하였다.

결과

1. 일치도

이화백신효능연구센터에서 수행된 다중구슬 폐구균 혈청형 분석법이 정확도를 보이는지 확인하기 위해 UAB에서 혈청형이 알려진 총 75가지 검체에 대한 일치도를 보았다. 다중구슬 폐구균 혈청형 분석법에 포함되어 있는 모든 혈청형이 이 75가지 검체를 통해 각각 확인될 수 있도록 구성되어 있었다. 단클론항체를 이용한 혈청형 분석법(반응 A)의 정확도를 위해 보내진 28가지의 검체는 반응 A에서 혈청형을 결정할 수 있었다. 28개의 폐구균 검체를 통해 반응 A에 포함되어 있는 26가지 혈청형이 고루 결과값으로 나와 반응 A에 포함된 피막다당이 결합된 다중구슬 모두가 안정적으로 결과값을 낼 수 있음이 확인되었다. 이 중 3가지 검체는 2종류의 혈청형으로 나왔다. PCR을 이용한 혈청형 분석법(반응 B)을 위한 22가지 검체 역시 모두 반응 B에서 확인할 수 있는 혈청형으로 분석되었다. 이 검체들로 반응 B에서 확인 가능한 33가지 혈청형에 대한 21가지 반응이 확인되었다. 이 중 1개 검체는 2 종류의 혈청형인 것으로 확인되었다. 35가지 혈청형에 대한 22가

지 반응이 있는 PCR의 또 다른 세트인 반응 C도 25가지 검체로 확인한 결과 모든 반응의 결과를 낼 수 있음을 확인하였다. 이 중 3개 검체는 2종류 혈청형으로 나왔다. 이렇게 나온 결과를 UAB로 보내어 실제 검체의 혈청형 값과 대조하였고 모든 검체의 혈청형이 100% 일치하였다. 두 가지 혈청형이 섞여 있던 검체 7가지에 대해서도 모든 검체들에서 두 가지 혈청형 결과가 모두 일치함을 확인하였다.

2. 특이도

각 검체에서 실제 혈청형으로 나온 결과값 외의 혈청형에 대해서 위양성반응을 보였던 경우는 없었다. Fig. 2에서 반응 A, B, C 각각의 반응으로 혈청형이 확인되었던 검체 5개의 흐름세포측정 결과를 그래프로 나타내었다. 반응 A에서의 신호 강도는 다중 구슬에 결합된 피막다당에 단클론항체가 결합된 것을 나타내는데 검체에 들어있는 폐구균의 혈청형에 대해서는 단클론항체가 다중구슬에 있는 피막다당과 경쟁적 결합을 하게 되어 해당 혈청형의 신호강도가 억제되게 된다. Fig. 2A의 경우 혈청형 5가 결합되어 있는 다중구슬의 영역에서만 3% 이하로 특이적으로 억제되는 것을 확인할 수 있다. 다른 혈청형의 피막다당이 결합되어 있는 다중구슬 영역에 대해서는 모든 검체에서 90% 이상의 신호가 유지되어 확연하게 구분되었다. 반응 B, C에서는 검체에 들어 있는 폐구균의 wzy 유전자가 자신의 혈청형에 해당하는 탐색자가 결합되어 있는 다중구슬에 결합하여 유전자 증폭이 일어나게 되어 해당 혈청형의 구슬 영역에서의 신호 강도가 증가되게 된다. Fig. 2B, 2C에서 혈청형 18과 혈청형 11B/C의 wzy에 대한 탐색자가 결합되어 있는 다중구슬영역에서 다른 영역의 신호 강도에 비해 100배 가까이 증가되어 분명한 차이를 보여주었다. 이를 통해 검체의 해당 혈청형에만 특이적인 반응을 하고 위양성을 일으킬 수 있는 비특이적 신호는 보이지 않아 높은 특이도를 보임을 확인하였다.

3. 임상분리 폐구균 분석

총 3개 대학병원에서 무증상 보균자와 침습 감염 환자에서 분리된 528개의 폐구균 검체에 대해 분석하였다. 분석은 반응 A부터 혈청형을 판단하여 혈청형이 결정되지 못한 검체에 대해서 다음 반응 B, C를 진행하였다. 분석된 혈청형 결과는 Table 2에 나타내었다. 전체 528개 균주 중 498개 균주의 혈청형이 확인되었고 이는 전체 균주의 94.3%에 해당하였다. 이 중 73.3% (387/528)의 균주는 반

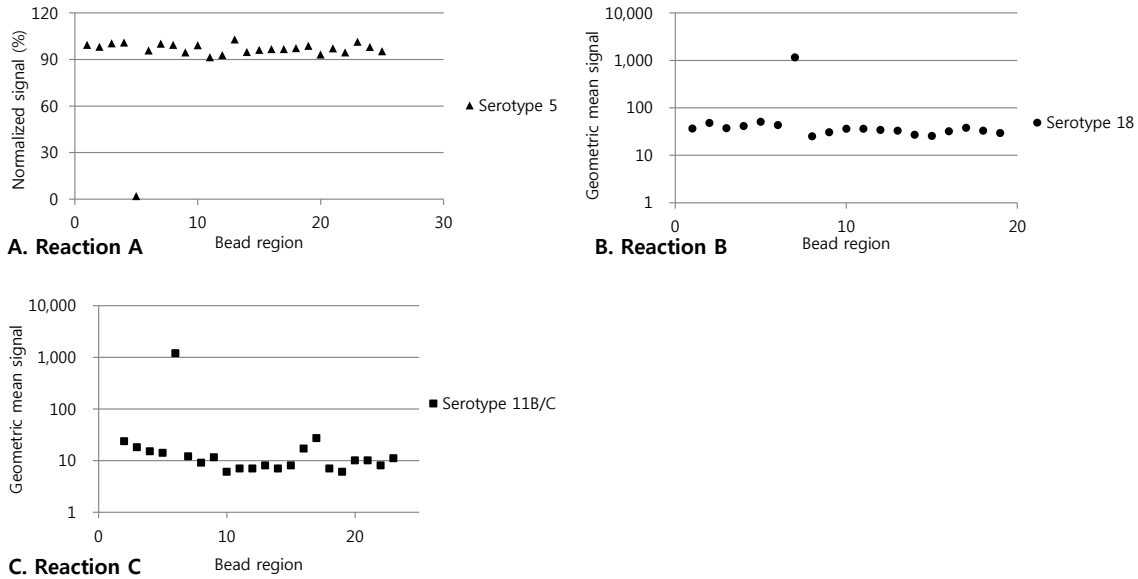


Fig. 2. Specificity of multibead serotyping assay. (A) Normalized fluorescence signals of the beads coated with pneumococcal polysaccharides obtained with the panel of a test sample by use of the multiplexed inhibition type immunoassay with monoclonal antibodies (Reaction A). The numbers on the X axis represents the numbers assigned to the bead regions in the test. (B and C) Geometric mean signal of the beads coated with probes obtained with the panel of each sample by use of the PCR-based multiplexed assay (Reaction B and C). The numbers on the X axis represents the numbers assigned to the bead regions in the test.

응 A만으로 결과를 확인할 수 있었고 반응 B까지 진행하였을 때 84.3% (445/528)의 균주의 혈청형을 확인할 수 있었다.

고찰

이번 연구에서는 2005년 소개되고 발전되어 2011년 세 가지 단계의 반응으로 발전시켜, 알려져 있는 거의 대부분의 폐구균 혈청형들을 분석할 수 있게 된 다중구슬 혈청형 분석법을 국내에 구축하여 실제 폐구균의 분석에 적용해보았다. 6가지의 주요 시약을 제공 받아 정해진 방법을 적용하는 것만으로 용이하게 혈청형 분석 시스템을 구축할 수 있었다. 또한 결과는 객관적 수치화된 결과값으로 나타나 이를 분석하고 혈청형을 결정하는 과정이 신뢰도 있게 진행될 수 있었다. 구축된 혈청형 분석 시스템의 검사 유효성을 확인하고자 UAB에서 보낸 암호화된 검체 분석 결과 전체 일치하는 결과를 얻어 정확도를 확보하였다. 또한 검체의 각 혈청형에만 특이적인 반응을 보이고 그 외의 혈청형에 대한 반응과는 큰 신호 차이를 나타내어 특이도도 높은 것으로 확인되었다. 실제 임상 검체들을 분석한 결과 전체 분리 균주 중 94.3%의 혈청형을 확인하였

다. 전체 528개 균주의 혈청형을 분석하기 위해 폐구균 용해물 제조과정을 제외하고 분석에만 3일이 소요되어 매우 짧은 시간 내에 많은 균주의 분석 결과를 낼 수 있었다.

다중구슬 분석법은 숙련된 검사자가 없는 검사실에서도 객관적이며 정확하고 신뢰성 있는 검사 시스템을 구축할 수 있다는 것 외에도 많은 장점들이 있다. 먼저 동시에 여러 검체를 검사할 수 있어 군 역학 조사를 하는 대규모의 연구에서 활용 가치가 높다. 특히 한 명에게서 여러 혈청형의 균이 분리되는 보균 연구에서는 큰 장점이 된다¹²⁾. 96 well 판 1개당 대조균을 위한 3개 well 제외하고 모두 검체를 넣을 수 있으며 흐름 세포분석기를 이용해 많은 부분이 자동화되어 있다. 기존의 소개된 검사법들은 이 시스템만큼 다수의 검체를 다수의 혈청형에 대해서 분석할 수 없었다^{6,7,13-15)}. 그리고 다중구슬 분석법은 3 단계의 반응을 거쳐 분석하는 방법으로 이루어져있지만 일단 반응 A에서 혈청형이 결정된다면 다음 단계로 넘어갈 필요가 없다. 최근 발표되었던 2006년부터 2010년까지의 국내 침습성 감염환자에서 분리된 폐구균의 혈청형 분포 자료에 따르면 반응 A만으로도 92.7% (127/137)의 분리된 폐구균의 혈청형을 결정할 수 있다¹⁶⁾. 반응 B까지로는 혈청형을 알 수 있었던 137개 균주 전체에 대해서 분석이 가능하다. 실제 이번 연구에서 임상 검체를 분석한 자료에서도

Table 2. Serotyping Results Deduced by Multibead Serotyping Assay for 528 Clinical Isolates

Reaction A		Reaction B		Reaction C	
Serotype	Number of isolates (%)	Serotype	Number of isolates (%)	Serotype	Number of isolates (%)
1	8 (1.5)	16F	4 (0.8)	13	9 (1.7)
3	25 (4.7)	23A	16 (3.0)	24F/24A/24B	3 (0.6)
4	5 (0.9)	25F/25A/38	6 (1.1)	15A/15F	17 (3.2)
5	3 (0.6)	34	17 (3.2)	31	1 (0.2)
6A	36 (6.8)	35B	15 (2.8)	NCC1 [†]	19 (3.6)
6B	17 (3.2)			NCC2	4 (0.8)
6C/6D	27 (5.1)				
7F/7A	1 (0.2)				
8	3 (0.6)				
9N	3 (0.6)				
9V/9A	13 (2.5)				
10A/39	3 (0.6)				
11A/D/F	36 (6.8)				
11E/(11A/D/F)	3 (0.6)				
12F	3 (0.6)				
14	11 (2.1)				
15B/15C	22 (4.2)				
17F/17A	2 (0.4)				
18C	3 (0.6)				
19A	65 (12.3)				
19F	51 (9.7)				
20	5 (0.9)				
22F/22A	2 (0.4)				
23F	32 (6.1)				
33F/33A	2 (0.4)				
2 serotypes in a sample*	6 (1.1)				
Sum	381 (73.3)	Sum	58 (11.0)	Sum	53 (10.0)
Total 498 (94.3) [†]					

*11A, 23F; 14, 19F; 4, 23F; 9V, 19A; 3, 19A; 6A, 19F.

[†]Nontypeable isolates: 30 (5.7).

Abbreviations: NCC, null capsule clade.

반응 A만으로 전체 분리 균주의 73.3%가 분석 가능하였다. 이처럼 본 분석법은 백신 관련 혈청형부터 순차적으로 3가지 반응을 이어갈 수 있게 구성되어 대부분의 경우 반응 A 만으로도 빠르게 결과를 알 수 있고 반응 C까지 진행하면 백신 사용이 확대된 후 혈청형 대체로 새롭게 나타나는 우세한 혈청형이나 nontypeable 혈청형까지 확인할 수 있다. 이는 한 균주의 혈청형을 결정 짓기 위해 pool, type, group, factor 혈청으로 수차례 단계적 반응을 해야 하는 기존의 Quellung 반응법과 비교한다면 편의성에서 매우 우위를 차지하는 장점이다.

다중구슬 분석법은 시스템 안에서 혈청형을 분석하는

본연의 목적 외에도 폐구균에 대한 추가적인 검사에 활용 할 수 있는 가능성이 있다. 우선 시동체 등을 추가하여 폐구균을 확인하는 검사를 할 수 있다. 실제로 현재 검사법에 반응 B와 C에서 *lytA*, *cpsA* 등을 추가하여 폐구균인지 확인하고 무피막 균의 경우 하위 분류를 확인할 수 있게 하였다¹⁷⁾. 이러한 시스템의 유연성은 *mefA*, *ermB*와 같은 폐구균의 항생제 내성관련 유전자 screening을 포함시킴으로써 혈청형 분석과 항생제 내성확인까지 함께 하는 것이 가능하다^{18,19)}. 이 시스템에 추가되는 검사들을 통해 폐구균 역학 연구에서 적은 노력으로 많은 정보를 얻을 수 있을 것이다. 특히 반응 A의 경우는 면역학적 검사법으로

결과 값을 정량적으로 측정하기 때문에 측정 대상을 폐구균 용해물이 아닌 사람으로부터 채취한 흉수액, 뇌척수액 같은 검체를 이용하는 경우 그 혈청형 뿐 아니라 검체 안의 항원의 양에 대한 정보도 줄 수 있다. 그리고 한 번에 많은 수의 혈청형에 대해 분석할 수 있기 때문에 새로운 혈청형의 발견에 도움을 줄 수 있다. 실제로 6A로 알고 있던 균주를 다중구슬 분석법으로 검사했을 때 혈청형 확인 불가로 나와 추가 분석을 하여 새로운 혈청형 6C를 보고하기도 하였다²⁰⁾.

많은 장점들에도 불구하고 몇 가지 제한점들이 존재한다. 일부 혈청형 즉 18A, 18B의 경우에는 반응 C까지 진행해도 현재 시스템에서는 분별이 되지 않는다. 또한 반응 B와 C는 면역학적 검사법이 아니라 유전자형으로 혈청형을 결정하는 것이므로 반응 A에 포함되지 않은 혈청형의 경우 다른 분자유전학적 혈청형 분석법이 가지는 한계점과 마찬가지로 실제 표현형과는 다른 결과를 보일 수 있다. 또한 이번 실험에 사용하였던 주요 시약들은 현재 상용화되어 판매되고 있는 것이 아니므로 UAB로 부터 공급받아야 하는 제한점이 있다.

현재 다양한 백신 제조사들에서는 폐구균 백신에 혈청형을 추가한 새로운 백신들을 연구하고 있다. 또한 지역마다 다른 혈청형 분포가 다르며 혈청형마다 병독성과 항생제 내성의 차이 등이 있을 수 있어 폐구균의 혈청형 분포에 대한 감시는 매우 중요하다. 간단하고 빠르며 적은 노력으로 객관적인 결과를 얻을 수 있는 다중구슬 혈청형 분석법은 대규모 폐구균 역학 연구를 가능하게 하여 새로운 혈청형, 혈청형의 분포 변화 등에 대한 많은 정보를 제공하는 수단이 될 수 있을 것이다. 한편 면역학적 분석법과 유전자 검사를 이용한 검사법의 두 종류가 융합되어 있는 시스템이므로 적절한 시약만 추가한다면 여러 검사를 함께 진행할 수 있어 향후 폐구균 관련 검사 정보들이 발달함에 따라 함께 발전 확대시켜 나갈 수 있을 것이다. 또한 폐구균 외에 수막구균, B형 연쇄상구균 등 다른 균의 혈청균 분석 연구에서도 응용해 볼 수 있을 것이다.

감사의 글

다중구슬 분석법의 실험법과 주요 시약을 제공해주신 University of Alabama at Birmingham의 Moon H. Nahm 교수께 깊은 감사를 드립니다. 이 연구는 식약처 용역연구(11172바약안360)로 수행되었습니다.

References

1. Bentley SD, Aanensen DM, Mavroidi A, Saunders D, Rabinowitz E, Collins M, et al. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet* 2006;2:e31.
2. Calix JJ, Nahm MH. A new pneumococcal serotype, 11E, has a variably inactivated wjE gene. *J Infect Dis* 2010;202:29-38.
3. Park IH, Geno KA, Yu J, Oliver MB, Kim KH, Nahm MH. Genetic, biochemical, and serological characterization of a new pneumococcal serotype, 6H, and generation of a pneumococcal strain producing three different capsular repeat units. *Clin Vaccine Immunol* 2015;22:313-8.
4. Hicks LA, Harrison LH, Flannery B, Hadler JL, Schaffner W, Craig AS, et al. Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998-2004. *J Infect Dis* 2007;196:1346-54.
5. Lund E. Laboratory diagnosis of pneumococcus infections. *Bull World Health Organ* 1960;23:5-13.
6. Slotved HC, Kalsoft M, Skovsted IC, Kernn MB, Espersen F. Simple, rapid latex agglutination test for serotyping of pneumococci (Pneumotest-Latex). *J Clin Microbiol* 2004;42:2518-22.
7. Pai R, Gertz RE, Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol* 2006;44:124-31.
8. Magomani V, Wolter N, Tempia S, du Plessis M, de Gouveia L, von Gottberg A. Challenges of using molecular serotyping for surveillance of pneumococcal disease. *J Clin Microbiol* 2014;52:3271-6.
9. 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.
10. Yu J, Lin J, Kim KH, Benjamin WH, Jr., Nahm MH. Development of an automated and multiplexed serotyping assay for *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Vaccine Immunol* 2011;18:1900-7.
11. Yu J, Carvalho Mda G, Beall B, Nahm MH. A rapid pneumococcal serotyping system based on monoclonal antibodies and PCR. *J Med Microbiol* 2008;57:171-8.

12. Turner P, Turner C, Jankhot A, Phakaudom K, Nosten F, Goldblatt D. Field evaluation of culture plus latex sweep serotyping for detection of multiple pneumococcal serotype colonisation in infants and young children. PLoS One 2013; 8:e67933.
13. Siira L, Kaijalainen T, Lambertsen L, Nahm MH, Toropainen M, Virolainen A. From Quellung to multiplex PCR, and back when needed, in pneumococcal serotyping. J Clin Microbiol 2012;50:2727-31.
14. Dhoubhadel BG, Yasunami M, Yoshida LM, Thi HAN, Thi THV, Thi TAN, et al. A novel high-throughput method for molecular serotyping and serotype-specific quantification of *Streptococcus pneumoniae* using a nanofluidic real-time PCR system. J Med Microbiol 2014;63:528-39.
15. Findlow H, Laher G, Balmer P, Broughton C, Carrol ED, Borrow R. Competitive inhibition flow analysis assay for the non-culture-based detection and serotyping of pneumococcal capsular polysaccharide. Clin Vaccine Immunol 2009;16: 222-9.
16. Cho EY, Lee H, Choi EH, Kim YJ, Eun BW, Cho YK, et al. Serotype distribution and antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolated from invasive infections after optional use of the 7-valent conjugate vaccine in Korea, 2006-2010. Diagn Microbiol Infect Dis 2014;78:481-6.
17. Hathaway LJ, Stutzmann Meier P, Battig P, Aebi S, Muhlemann K. A homologue of aliB is found in the capsule region of nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol 2004;186:3721-9.
18. Nagai K, Shibasaki Y, Hasegawa K, Davies TA, Jacobs MR, Ubukata K, et al. Evaluation of PCR primers to screen for *Streptococcus pneumoniae* isolates and β -lactam resistance, and to detect common macrolide resistance determinants. J Antimicrob Chemother 2001;48:915-8.
19. Kawaguchiya M, Urushibara N, Ghosh S, Kuwahara O, Morimoto S, Ito M, et al. Serotype distribution and susceptibility to penicillin and erythromycin among noninvasive or colonization isolates of *Streptococcus pneumoniae* in northern Japan: A cross-sectional study in the pre-PCV7 routine immunization period. Microb Drug Resist 2014;20: 456-65.
20. Park IH, Pritchard DG, Cartee R, Brandao A, Brandileone MC, Nahm MH. Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol 2007;45:1225-33.

요약

목적: 폐구균의 혈청형 분석은 백신의 효능을 평가하고 감시하는데 매우 중요하다. 그러나 폐구균의 혈청형 분석이 힘들기 때문에 최근 라텍스 구슬과 흐름세포측정기를 이용한 다중구슬 혈청형 분석법이 소개되었다. 이 연구에서는 새로운 혈청형 분석법을 이화백신연구센터에서 구축하고 실제 임상 검체들에 적용해보았다.

방법: 라텍스 구슬 3종과 폐구균 피막다당 특이 단클론항체 1가지, 시동체 2종을 University of Alabama at Birmingham에서 제공 받았다. 이 시료들을 이용하여 단클론항체와 *wzy* 다중 PCR을 이용한 다중구슬 혈청형 분석법을 확립하였다. 그리고 75개의 혈청형이 알려져 있는 검체를 이용하여 이화백신효능연구센터에 확립된 다중구슬 혈청형 분석법의 정확도를 보았고 이를 토대로 528개의 임상 검체를 분석해 보았다.

결과: 다중구슬 혈청형 분석법은 이화백신효능연구센터에 안정적으로 확립되었다. 75종의 이미 혈청형이 알려져 있는 검체를 암호화하여 분석한 결과 전부 일치하여 정확도가 높음을 보여 주었고 실제 임상 검체에도 적용한 결과 94.3% (498/528)에서 혈청형을 확인할 수 있었다.

결론: 다중구슬 분석법은 다수의 혈청형을 쉽고 빠르게 한번에 많은 수의 검체를 확인할 수 있는 객관적인 검사 방법으로 향후 임상적 진단과 역학연구 등의 폐구균의 혈청형 분석에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.