

МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ШТАММОВ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ У ПАЦИЕНТОВ ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА С ВНЕБОЛЬНИЧНЫМИ ПНЕВМОНИЯМИ

УДК 616.9–036.2+616.24–002–053.9

Поступила 11.02.2014 г.

© **А.В. Мартынова**, д.м.н., доцент кафедры эпидемиологии и военной эпидемиологии¹;
профессор кафедры биохимии, микробиологии и биотехнологии²;
Л.А. Балабанова, к.б.н., научный сотрудник лаборатории морской биохимии³;
О.А. Чулакова, аспирант кафедры эпидемиологии и военной эпидемиологии¹;
А.А. Шепарев, аспирант кафедры эпидемиологии и военной эпидемиологии¹

¹Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, 690002, пр. Острякова, 2;

²Школа естественных наук Дальневосточного федерального университета, Владивосток, 690022,
ул. Октябрьская, 27;

³Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения РАН,
Владивосток, 690022, пр. 100 лет Владивостоку, 159

Сохраняет актуальность проблема микробиологического мониторинга и эпидемиологического надзора за штаммами *S. pneumoniae* как одного из убиквитарных возбудителей, вызывающих внебольничные пневмонии и другие инфекции дыхательных путей различной степени тяжести.

Мультилокусное сиквенс-типирование является перспективным методом молекулярно-эпидемиологического мониторинга, позволяющего идентифицировать эпидемически опасные клоны убиквитарных возбудителей.

Цель исследования — оценить при помощи метода мультилокусного сиквенс-типирования характер распространения эпидемически значимых штаммов *Streptococcus pneumoniae* у пациентов пожилого возраста с внебольничной пневмонией, бронхитами и у носителей, а также определить доминирующий генотип.

Материалы и методы. Проведено исследование 14 штаммов, выделенных у пациентов с внебольничными пневмониями (из них 7 — полирезистентных), 8 штаммов — от пациентов с хронической обструктивной болезнью легких, 4 штаммов — от носителей. Мультилокусное сиквенс-типирование выполнено согласно методике М.С. Enright and В.С. Spratt (1998).

Результаты. Штаммы, выделенные во всех трех популяциях, представляют собой родственные изоляты вида *Streptococcus pneumoniae*, большинство из которых (18 из 26) обладают уникальным генотипом, определяющим наличие одного сиквенс-типа для каждого штамма. Из 14 штаммов, выделенных у лиц пожилого возраста с внебольничной пневмонией, 6 относились к профилю *Taiwan 19F-14*. Среди штаммов, выделенных от носителей, превалировал штамм, идентичный штамму *R6*. Среди штаммов, выделенных от пациентов с хронической обструктивной болезнью легких, превалирования какого-либо генотипа не установлено.

Заключение. Мультилокусное сиквенс-типирование позволяет идентифицировать новые генотипы *S. pneumoniae* и дать прогноз относительно появления эпидемически опасных штаммов с новыми свойствами.

Ключевые слова: мультилокусное сиквенс-типирование; пневмококковые пневмонии; внебольничные пневмонии; *S. pneumoniae*.

English

Molecular Epidemiological Monitoring of *Streptococcus Pneumoniae* Strains Isolated in Elderly Patients with Common-Acquired Pneumoniae

A.V. Martynova, D.Med.Sc., Associate Professor, the Department of Epidemiology and Military Epidemiology¹;
Professor of the Department of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology²;
L.A. Balabanova, PhD, Research Worker, the Marine Biochemistry Laboratory³;
O.A. Chulakova, Postgraduate, the Department of Epidemiology and Military Epidemiology¹;
A.A. Sheparov, Postgraduate, the Department of Epidemiology and Military Epidemiology¹

Для контактов: Мартынова Алина Викторовна, тел. моб. +7 914-701-69-08; e-mail: clinmicro@yandex.ru

¹Pacific State Medical University, Ostryakov Avenue, 2, Vladivostok, Russian Federation, 690002;

²School of Natural Sciences, Far Eastern Federal University, Oktyabr'skaya St., 27, Vladivostok, Russian Federation, 690022;

³G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Prospect 100 let Vladivostoku, 159, Vladivostok, Russian Federation, 690022

The problem of microbiological monitoring and epidemiological surveillance over *S. pneumoniae* strains as one of ubiquitous agents causing common-acquired pneumonias and other respiratory infections of different severity is still urgent.

Multi-locus sequence typing is a promising technique of molecular epidemiological monitoring enabling to identify epidemically dangerous clones of ubiquitous agents.

The aim of the investigation was to assess the spread of epidemically significant *Streptococcus pneumoniae* strains by multi-locus sequence typing in elderly patients with common-acquired pneumoniae, bronchites, and agents, and identify a dominant genotype.

Materials and Methods. We studied 14 strains isolated in patients with common-acquired pneumoniae (among them 7 — multi-resistant), 8 strains — in patients with chronic obstructive pulmonary disease, 4 strains — in the carriers. Multi-locus sequence typing was carried out in accordance with M.C. Enright and B.G. Spratt technique (1998).

Results. All strains isolated in three populations are relative isolates of *Streptococcus pneumoniae*, and the majority of them (18 of 26) have a unique genotype determining the presence of one sequence type for each strain. From 14 strains isolated in elderly patients with common-acquired pneumoniae, 6 belonged to *Taiwan 19F-14*. Among the strains isolated in the carriers, the strain identical to *R6* strain prevailed. No genotype was found to prevail among the strains isolated in patients with chronic obstructive pulmonary disease.

Conclusion. Multi-locus sequence typing enables to identify new genotypes of *S. pneumoniae* and prognosticate the appearance of epidemically dangerous strains with new properties.

Key words: Multi-locus sequence typing; pneumococcal pneumoniae; community-acquired pneumoniae; *S. pneumoniae*.

Внебольничные пневмонии среди лиц пожилого возраста продолжают оставаться актуальной проблемой современной медицины [1–4]. Распространенность их в Москве составляет 17,4‰, а в США — 20–40‰ [4]. У пожилых людей заболеваемость внебольничной пневмонией в 2 раза выше, чем у лиц молодого возраста; частота госпитализаций при этом заболевании с возрастом увеличивается более чем в 10 раз [5, 6]. Летальность при пневмонии среди больных старше 60 лет в 10 раз выше, чем в других возрастных группах, и достигает 10–15% при пневмококковых пневмониях [4]. Учитывая тот факт, что *S. pneumoniae* является одним из основных возбудителей внебольничных пневмоний в разных возрастных группах, а носительство этого возбудителя чрезвычайно распространено [4–7], представляют интерес проведение и оценка значимости эпидемиологических исследований пневмококковых пневмоний у лиц пожилого возраста.

Наиболее важной проблемой при изучении пневмококковых пневмоний у пожилых лиц является организация контроля за распространением антибиотикорезистентных изолятов [7–9], а также молекулярно-эпидемиологический мониторинг выделяемых изолятов. В настоящее время такого рода мониторинг выполняется с помощью метода генотипирования, который позволяет получить стандартизованную информацию о распространении того или иного изолята. Информация о характере выявляемых штаммов *S. pneumoniae* дает возможность планировать профилактические мероприятия в отношении пневмококковой инфекции.

Одним из методов, предназначенных для молекулярно-эпидемиологического мониторинга, является мультилокусное сиквенс-типирование (Multilocus sequence typing — MLST), основанное на исследовании вариативности фрагментов, что позволяет создать

фактически индивидуальный аллельный профиль каждого штамма и в том числе охарактеризовать его эпидемическую значимость [10–13].

Применение MLST в исследовании пневмококка, обладающего высокой способностью к естественной трансформации, дает возможность определить отдельные клональные группы и выявить их эпидемическую значимость [9, 12]. При этом следует учесть, что сиквенс-типы, дифференцируемые MLST, могут обладать различными серотипами (фенотипической вариативностью), что обусловлено процессами микроэволюции, происходящими в микробиоценозе, частью которого является *S. pneumoniae*.

Цель исследования — оценить при помощи метода мультилокусного сиквенс-типирования характер распространения эпидемически значимых штаммов *Streptococcus pneumoniae* у пациентов пожилого возраста с внебольничной пневмонией, бронхитами и у носителей, а также определить доминирующий генотип.

Материалы и методы. Учитывая тот факт, что одной из наиболее значимых эпидемических характеристик является устойчивость к антибактериальным химиопрепаратам и в том числе полирезистентность, в исследование взяли равное количество полирезистентных и чувствительных к антибиотикам штаммов пневмококка: 1-я группа (n=14) — штаммы, выделенные от пациентов пожилого возраста с внебольничными пневмониями (7 — полирезистентных и 7 — чувствительных к антибиотикам); 2-я группа (n=8) — штаммы, выделенные от пожилых пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) (по четыре чувствительных и полирезистентных штамма); 3-я группа (n=4) — штаммы от пожилых носителей. Под полирезистентностью понимали устойчивость штаммов пневмококка к пенициллину и эритромицину.

Мультилокусное сиквенс-типирование проведено

согласно методике M.C. Enright and B.G. Spratt [11]. Праймеры, использованные в исследовании, могут быть представлены следующим образом:

- ddl*-up, 5' TGCC/TCAAGTTCTTATGTGG и *ddl*-dn, 5' CACTGGGTG/AAAACCA/TGGCAT;
- gdh*-up, 5' ATGGACAAACCAGCNAGC/TTT и *gdh*-dn, 5' GCTTGAGGTCCCATG/ACTNCC;
- gki*-up, 5' GGCATTGGAATGGGATCACC и *gki*-dn, 5' TCTCCCGCAGCTGACAC;
- recP*-up, 5' GCCAACTCAGGTCATCCAGG и *recP*-dn, 5' TGCAACCGTAGCATTGTAAC;
- spi*-up, 5' TTATTCCTCCTGATTCTGTC и *aspi*-dn, 5' GTGATTGGCCAGAAGCGGAA;
- xpt*-up, 5' TTATTAGAAGAGCGCATCCT и *xpt*-dn, 5' AGATCTGCCTCTTAAATAC.

В связи с общепринятым в мировой практике эпидемиологического надзора за пневмококковой инфекцией использованием метода серотипирования мы применили эту методику с целью сравнения контрольных данных с данными, полученными при MLST. Все штаммы были серотипированы согласно общепринятой методике [12] с использованием Pneumotest panel (Statens Seruminstitut, Копенгаген, Дания). Серотипы, не включенные в панель, были идентифицированы в институте Statens Seruminstitut (Дания) [12].

В процессе серотипирования брали единичные колонии суточной культуры: каплю (25 мкл) помещали в соответствующую секцию панели. В качестве контроля использовали физиологический раствор в равном объеме. Затем стерильной зубочисткой или микробиологической петлей помещали небольшое количество полученной культуры в каплю антисыворотки и аккуратно перемешивали, равномерно распределяя ее по всему объему. Далее панель, на которой ставилась реакция, покачивали до появления агглютинации (последняя происходила в случае реакции бактериальных антигенов со специфической антисывороткой в течение 1 мин при комнатной температуре) и затем изучали при фазовой контрастной микроскопии согласно рекомендациям производителя (Statens Serum Institute, Дания).

Были использованы следующие реактивы: omni-сыворотка, идентифицирующая капсулу пневмококка; группоспецифическая антисыворотка (группы А и I, Р и Т); типовая сыворотка для идентификации отдельных серотипов; групповая сыворотка, реагирующая со всеми серотипами пневмококков внутри одной группы; сыворотка для внутриродового типирования [12].

Результаты и обсуждение. Для изучения возможности формирования госпитального полирезистентного штамма *S. pneumoniae*, происходящего от единичного клона, мы провели MLST популяций штаммов пневмококка, выделенных в

различных биотопах и обладающих различной антибактериальной резистентностью. Сравнивали популяции штаммов, выделенных при внебольничных пневмониях (всего 14 штаммов: 7 штаммов, устойчивых к пенициллину и эритромицину, и 7 штаммов, чувствительных к антибактериальным химиопрепаратам); штаммов, выделенных у пациентов с ХОБЛ (всего 8 штаммов: 4 штамма, устойчивых к пенициллину и эритромицину, и 4 штамма, чувствительных к антибактериальным химиопрепаратам); и штаммов, выделенных у носителей (2 штамма, чувствительных к антибактериальным химиопрепаратам, и 2 штамма, не чувствительных к антибактериальным химиопрепаратам). Всего в исследовании участвовало 26 штаммов.

Анализ изучаемых популяций методом MLST выявил, что все штаммы, выделенные от разных групп больных и носителей, представляют собой родственные изоляты вида *Streptococcus pneumoniae*, большинство из которых (18 из 26) обладают уникальным генотипом, определяющим наличие одного сиквенс-типа для каждого штамма. При этом из всего множества изученных штаммов можно сформировать 6 кластерных групп, которые содержат штаммы, выделенные от разных больных, обладающие различными молекулярно-эпидемиологическими характеристиками (серотип, устойчивость к антибактериальным химиопрепаратам), и которые являются генетически близкородственными.

Результаты MLST штаммов, выделенных у пациентов с внебольничными пневмониями (рис. 1), позво-

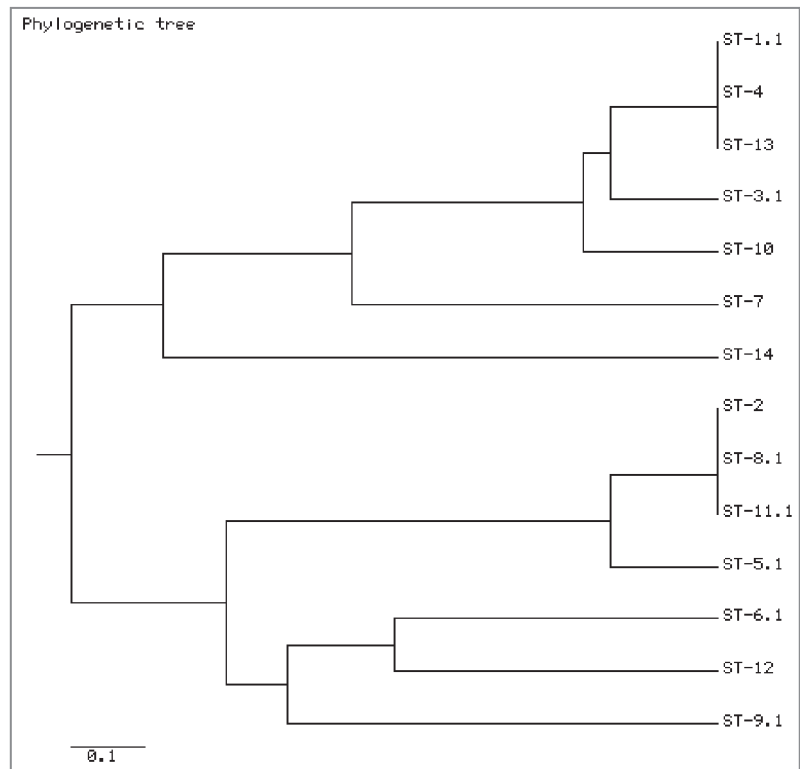


Рис. 1. Результаты мультилокусного сиквенс-типирования штаммов *S. pneumoniae*, выделенных у пациентов с внебольничной пневмонией (штаммы с расширением 1 — полирезистентные, без расширения — чувствительные к антибиотикам), всего 14 штаммов

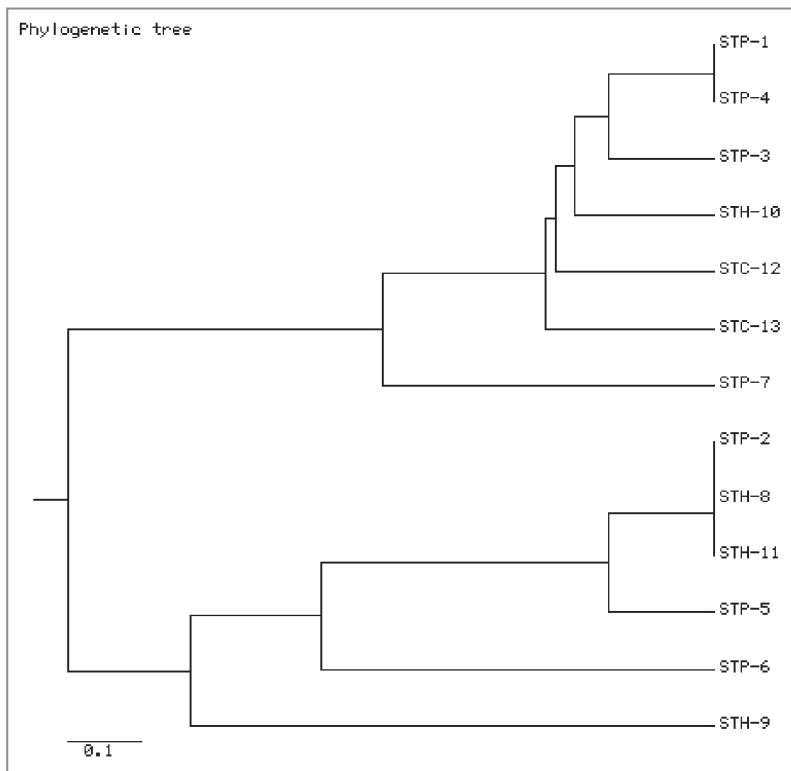


Рис. 2. Результаты мультилокусного сиквенс-типирования полирезистентных штаммов пневмококка, выделенных во всех группах пациентов (всего 13 штаммов)

ляют сделать вывод, что полирезистентные штаммы формируются при внебольничных пневмониях путем горизонтального переноса генетического материала: это подтверждается наличием двух клональных комплексов, в одном из которых присутствует один полирезистентный штамм (клональный комплекс, содержащий ST-1.1, ST-4, ST-13), а в другом — два (ST-2, ST-8.1, ST-11.1). Все это показывает возможность формирования полирезистентности у штаммов пневмококка, выделенных у пациентов с внебольничной пневмонией.

Анализ распространения близкородственных в генетическом отношении штаммов показывает, что из четырех полирезистентных выделенных нами у носителей изолятов пневмококка два являются представителями единого клонального комплекса. Это позволяет говорить о том, что и у носителей в обычных условиях протекают процессы внутригеномной перестройки штаммов, которые могут привести к формированию госпитального изолята и, соответственно, требуют профилактических мероприятий.

Сопоставив результаты MLST всех полирезистентных штаммов (рис. 2), мы пришли к выводу, что наиболее высока вероятность к осуществлению горизонтального переноса в полирезистентных штаммах, выделяющихся у лиц пожилого возраста с ХОБЛ, а также в штаммах, выделенных у пациентов с внебольничной пневмонией (см. таблицу).

Таким образом, в результате анализа генетического разнообразия штаммов *S. pneumoniae* среди изученных нами 26 чувствительных и нечувствительных (т.е. умеренно-устойчивых и устойчивых) к пенициллину и эритромицину штаммов выделено 22 различ-

ных сиквенс-типа и 4 клональных комплекса. При этом 2 комплекса представлены более чем одним изолятом.

Необходимо отметить, что из 14 штаммов, выделенных у лиц пожилого возраста с внебольничной пневмонией, 6 относились к профилю *Taiwan 19F-14*, из них 4 обладали одинаковым профилем резистентности: были устойчивыми/умеренно-устойчивыми к пенициллину, эритромицину и клиндамицину. Генотипические характеристики проанализированных штаммов также показали высокую степень однородности выборки: все изоляты имели детерминанты резистентности к макролидным антибиотикам — гены *mefE* и *ermB* (что согласуется с фенотипическими данными). Основная характеристика штаммов *S. pneumoniae* генотипа *Taiwan 19F-14* — полирезистентность прежде всего по отношению к бета-лактамам и макролидам независимо от географической области выделения. Данный сиквенс-тип распространен в основном в Южной Корее, Вьетнаме и Гонконге.

Среди штаммов, вызвавших у лиц пожилого возраста ХОБЛ, методом MLST идентифицировано 2 различных сиквенс-типа, при этом каждый из них был представлен 3 изолятами (см. рис. 2).

Несмотря на небольшую выборку, штаммы, выделенные от носителей, оказались фенотипически неоднородными: 2 штамма были умеренно-устойчивы к пенициллину и 2 штамма — чувствительны. Все 4 штамма были не чувствительными к эритромицину. При этом два штамма принадлежали к сиквенс-типу, идентичному штамму *R6*, который является авирулентным и может рассматриваться как условно-патогенная микрофлора.

Молекулярно-эпидемиологическая характеристика полирезистентных к антибиотикам штаммов *S. pneumoniae* по данным MLST

Серотип	Гены «домашнего хозяйства»							MLST-тип	Резистентность			Минимально ингибирующая концентрация, мг/мл
	<i>aroE</i>	<i>gdh</i>	<i>gki</i>	<i>recP</i>	<i>spi</i>	<i>xpt</i>	<i>ddl</i>		к пенициллину	к эритромицину	к клиндамицину	
Штаммы, выделенные в 1-й группе (внебольничная пневмония, n=14)												
19F	7	11	10	1	6	8	14	162	Ч	У	У	1,4
9V	7	11	10	1	6	8	14	158	Ч	У	У	0,2
19F	1	5	4	12	5	3	8	423	Ч	У	У	0,5
6B	20	28	1	1	15	14	14	315	Ч	Уу	У	0,2
19F	4	4	2	4	4	1	1	81	Ч	У	У	0,2
23F	7	5	1	1	13	31	14	440	Ч	У	Уу	0,2
14	1	5	4	5	5	1	8	9	Ч	Уу	У	0,3
Н/т	1	5	4	5	5	1	8	9	У	Уу	У	0,5
14	7	5	1	8	14	11	14	124	У	Уу	У	0,2
18С	7	2	1	1	10	1	21	113	У	Уу	У	0,2
6А	2	7	4	10	10	1	27	176	У	Уу	У	1
15В	8	13	14	4	17	4	14	95	Уу	Уу	У	0,5
15С	8	13	14	4	17	4	14	201	У	Уу	У	0,15
Н/т	8	13	14	4	17	4	14	199	У	У	У	1
Штаммы, выделенные во 2-й группе (ХОБЛ, n=8)												
9V	7	11	10	1	6	8	14	162	Уу	Уу	Ч	0,2
3	7	15	2	10	6	1	22	180	Уу	Уу	У	0,2
19F	1	8	9	1	6	4	6	311	Уу	У	У	0,8
6А	2	7	4	10	10	1	27	65	У	У	У	1
19F	1	8	4	1	1	4	6	36	У	Уу	У	2
23F	1	8	9	1	6	4	6	311	Уу	Уу	У	2
18С	7	2	1	1	10	1	21	113	У	У	У	1
23F	7	13	8	1	10	6	37	272	Уу	Уу	Ч	0,5
Штаммы от носителей (n=4)												
19F	1	8	10	4	9	1	3	341	Ч	Уу	У	1
19А	12	14	11	2	6	17	22	785	Уу	Уу	У	1
6В	8	37	9	29	2	12	53	344	Уу	Уу	У	0,02
6А	2	13	9	1	6	19	14	490	Уу	Уу	Ч	0,04

З д е с ь: Н/т — нетипируемые; У — устойчивый; Уу — умеренно-устойчивый; Ч — чувствительный.

Заключение. Мультилокусное сиквенс-типирование в настоящее время следует рассматривать как наиболее точный метод дифференцировки стрептококков и идентификации *S. pneumoniae* и как один из важнейших инструментов микробиологического мониторинга штаммов этого микроорганизма, что позволяет провести типирование и дать прогноз относительно появления штаммов с новыми свойствами, которые в перспективе могут стать госпитальными изолятами и потребовать совершенно новых мероприятий в отношении эпидемиологического надзора.

Финансирование исследования и конфликт интересов. Исследование не финансировалось какими-либо источниками, и конфликты интересов, связанные с данным исследованием, отсутствуют.

Литература

1. Бачинская Е.Н. Возбудители внебольничных пневмоний на пороге нового тысячелетия. Антибиотики и химиотерапия 2000; 45: 21–28.
2. Богданов М.Б., Черненькая Т.В. Микробиологическая

оценка антибактериальных препаратов, используемых для эмпирической терапии внебольничных инфекций нижних дыхательных путей. *Антибиотики и химиотерапия* 2000; 10: 15–19.

3. Унгуряну Т.Н., Гржибовский А.М. Внутригодовая динамика загрязнения атмосферного воздуха и обращаемости за медицинской помощью по поводу болезней органов дыхания. *Экология человека* 2011; 6: 37–42.

4. Дворецкий Л.И. Пожилой больной с внебольничной пневмонией. *Русский медицинский журнал* 2012; 6: 300–305.

5. Новиков Ю.К. Диагностика и лечение внебольничных пневмоний. *Русский медицинский журнал* 2001; 1: 11–16.

6. Ржаникова Н.И., Ржаникова А.Н. Внебольничная пневмония у пожилых: диагностика на амбулаторном этапе. *Академический журнал Западной Сибири* 2012; 3: 25–26.

7. Жильцов И.В., Семенов В.М. Бета-лактамазная активность мокроты и ее влияние на эффективность антибактериальной терапии. *Туберкулез и болезни легких* 2012; 4: 18–26.

8. Семенов В.М., Дмитраченко Т.И., Жильцов И.В. Микробиологические аспекты резистентности к антимикробным препаратам. *Туберкулез и болезни легких* 2012; 4: 18–26.

9. Zhang Y.J., Chen Y.S., Wang Z.W., et al. Serological and molecular capsular typing, antibiotic susceptibility and multilocus sequence typing of *Streptococcus pneumoniae* isolates from invasive and non-invasive infections. *Chin Med J (Engl)* 2013 Jun; 126(12): 2296–22303.

10. Enright M.C., Spratt B.G. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae* identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* 1998; 14: 5049–5060, <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-144-11-3049>.

11. O'Sullivan M.V., Sintchenko V., Gilbert G.L. Software for selecting the most informative sets of genomic loci for multi-target microbial typing. *BMC Bioinformatics* 2013 May 1; 14: 148, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-14-148>.

12. *Streptococcus pneumoniae. Textbook in serotyping, virulence factors and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring pneumococcal antibodies.* Copenhagen, Denmark: Statens Serum Institute, 2013.

13. Van Cuyck H., Pichon B., Leroy P., et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with multiple loci sequence typing. *BMC Microbiol* 2012 Oct 22; 12: 241, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-12-241>.

References

1. Bachinskaya E.N. Community-acquired pneumoniae agents at the turn of a new millennium. *Antibiotiki i khimioterapiya* 2000; 45: 21–28.

2. Bogdanov M.B., Chernen'kaya T.V. Microbiological analysis of antibacterial drugs used for empiric treatment of community-acquired infections of low respiratory tract. *Antibiotiki i khimioterapiya* 2000; 10: 15–19.

3. Unguryanu T.N., Grzhibovskiy A.M. Within-year changes of atmospheric air pollution and medical aid appealability due to respiratory diseases. *Ekologiya cheloveka* 2011; 6: 37–42.

4. Dvoretzkiy L.I. An older patients with common-acquired pneumoniae. *Russkij medicinskij zurnal* 2012; 6: 300–305.

5. Novikov Yu.K. Diagnostics and management of community-acquired pneumoniae. *Russkij medicinskij zurnal* 2001; 1: 11–16.

6. Rzhanikova N.I., Rzhanikova A.N. Community-acquired pneumoniae in elderly: out-patient diagnostics. *Akademicheskij zhurnal Zapadnoy Sibiri* 2012; 3: 25–26.

7. Zhil'tsov I.V., Semenov V.M. Beta-lactamase activity of sputum and its effect on antibacterial therapy efficiency. *Tuberkulez i bolezni legkikh* 2012; 4: 18–26.

8. Semenov V.M., Dmitrachenko T.I., Zhil'tsov I.V. Microbiological aspects of antimicrobial resistance. *Tuberkulez i bolezni legkikh* 2012; 4: 18–26.

9. Zhang Y.J., Chen Y.S., Wang Z.W., et al. Serological and molecular capsular typing, antibiotic susceptibility and multilocus sequence typing of *Streptococcus pneumoniae* isolates from invasive and non-invasive infections. *Chin Med J (Engl)* 2013 Jun; 126(12): 2296–22303.

10. Enright M.C., Spratt B.G. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae* identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* 1998; 14: 5049–5060, <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-144-11-3049>.

11. O'Sullivan M.V., Sintchenko V., Gilbert G.L. Software for selecting the most informative sets of genomic loci for multi-target microbial typing. *BMC Bioinformatics* 2013 May 1; 14: 148, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-14-148>.

12. *Streptococcus pneumoniae. Textbook in serotyping, virulence factors and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring pneumococcal antibodies.* Copenhagen, Denmark: Statens Serum Institute, 2013.

13. Van Cuyck H., Pichon B., Leroy P., et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with multiple loci sequence typing. *BMC Microbiol* 2012 Oct 22; 12: 241, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-12-241>.