

Н.М. Алябьева<sup>1</sup>, Т.А. Блинова<sup>1</sup>, О.А. Пономаренко<sup>1</sup>, А.В. Лазарева<sup>1</sup>, Л.К. Катосова<sup>1</sup>, Н.А. Маянский<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Научный центр здоровья детей РАМН, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Российская Федерация

# Молекулярное типирование *Streptococcus pneumoniae* методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с учетом распространенности серотипов в Российской Федерации

## Контактная информация:

Алябьева Наталья Михайловна, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГБУ «НЦЗД» РАМН

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, тел.: (499) 134-03-50, e-mail: alyabieva@nczd.ru

Статья поступила: 19.11.2013 г., принята к печати: 23.12.2013 г.

**Цель исследования:** сравнить классический серологический метод и метод молекулярного типирования *S. pneumoniae* с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции (М-ПЦР), модифицированной в соответствии с данными о циркулирующих в Российской Федерации серотипах. **Материалы и методы:** всего протестировано 420 изолятов пневмококка, преимущественно из нестерильных локусов. После микробиологической идентификации пневмококки серотипировали с помощью специфических антисывороток производства Statens Serum Institut (Дания) в реакциях латекс-агглютинации и/или набухания капсулы. Параллельно проводили серию М-ПЦР, максимально состоявшую из 7 последовательных реакций. **Результаты:** серологическим методом серотип определили у всех 420 штаммов *S. pneumoniae*; всего было идентифицировано 34 различных серотипа. При помощи М-ПЦР удалось типировать 95% (399/420) исследованных штаммов, причем 90% было типировано в первых трех М-ПЦР. Все ПЦР-нетипируемые изоляты ( $n = 21$ ) обладали серотипами, которые не входили в состав М-ПЦР. Результаты серологического и молекулярного типирования совпали у 99,2% (396/399) изолятов; 3 штамма показали противоречивые результаты: серологическим методом у них определили серотип 19А, а методом ПЦР — 19F. **Выводы:** предложенная модификация М-ПЦР позволяет правильно определить серотип более чем у 90% циркулирующих в Российской Федерации штаммов пневмококка, включая все серотипы, входящие в состав полисахаридных конъюгированных пневмококковых вакцин.

**Ключевые слова:** *Streptococcus pneumoniae*, серотип, мультиплексная ПЦР.

(Вопросы современной педиатрии. 2013; 12 (6): 30–34)

## ВВЕДЕНИЕ

*Streptococcus pneumoniae* (пневмококк) играет ведущую роль в структуре инфекционно-воспалительных заболеваний дыхательных путей. Являясь представите-

лем нормальной микрофлоры носоглотки, при определенных условиях он может вызывать как инвазивные (менингит, бактериемия), так и неинвазивные (отит, синусит, пневмония) инфекции. Наиболее поражаемым

Н.М. Alyab'eva<sup>1</sup>, Т.А. Blinova<sup>1</sup>, О.А. Ponomarenko<sup>1</sup>, А.В. Lazareva<sup>1</sup>, Л.К. Katosova<sup>1</sup>, N.A. Mayanskiy<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Scientific Centre of Children Health of RAMS, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Russian Federation

## Molecular Typing of *Streptococcus pneumoniae* by the Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay in Accordance to the Prevalence of Serotypes in the Russian Federation

**Aim:** to compare two methods of *S. pneumoniae* typing: classic serological method and the multiplex polymerase chain reaction (M-PCR) assay modified in accordance to the data on serotypes circulating in Russian Federation. **Materials and methods:** 420 pneumococcal isolates mainly from non-sterile loci were analyzed. After microbiological identification, pneumococci were serologically typed by specific antisera produced by Statens Serum Institute (Denmark) in latex agglutination test and/or capsular swelling method. In parallel, we performed series of the M-PCR, which consisted of 7 consecutive reactions at the most. **Results:** serotype was identified by the serological method in all 420 strains of *S. pneumoniae*; in total, we determined 34 different serotypes. By the means of the M-PCR, we succeeded in identification of 95% (399/420) examined strains, and 90% of them were typed in the first 3 reactions. All isolates failed to be typed by M-PCR ( $n = 21$ ) had serotypes that were not included into the composition of the M-PCR. The result of serological and molecular typing was identical in 99,2% (396/399) of the isolates; 3 strains showed contradictory results: serotype 19A was determined by the serological assay and serotype 19F — by M-PCR. **Conclusions:** the proposed modification of M-PCR allows correct identification of serotype in more than 90% of pneumococcal strains circulating in the Russian Federation, including all serotypes of pneumococcal polysaccharide conjugate vaccines.

**Key words:** *Streptococcus pneumoniae*, serotype, multiplex PCR.

(Voprosy sovremennoi pediatrii — Current Pediatrics. 2013; 12 (6): 30–34)

контингентом оказываются дети младше 5 лет и люди пожилого возраста. Таким образом, заболевания, ассоциированные с пневмококком, являются серьезной проблемой для здравоохранения, заслуживающей особого внимания [1–3].

В последние годы для профилактики инвазивных пневмококковых инфекций широко используют пневмококковые полисахаридные конъюгированные вакцины (ПКВ), эффективность которых была показана во многих странах, внедривших ПКВ в Национальные календари иммунизации [4–6]. В состав ПКВ входят капсульные полисахариды от 7 до 13 серотипов *S. pneumoniae*, которые обеспечивают серотипспецифический иммунный ответ. В настоящее время описано более 90 серотипов пневмококков, однако их вирулентность неодинакова, и большинство инвазивных пневмококковых инфекций связано с ограниченным набором (не более 15–20) клинически значимых серотипов [5, 7–9]. Спектр циркулирующих серотипов *S. pneumoniae* может варьировать в разных странах, поэтому для прогнозирования эффективности вакцинации требуются местные данные об актуальных серотипах пневмококка [7, 8, 10]. Кроме того, определение серотипового пейзажа *S. pneumoniae* на конкретной территории является важным методом эпидемиологического контроля, который позволит оценить влияние вакцинации на сероэпидемиологию пневмококка [11, 12].

Классическим методом серотипирования *S. pneumoniae* является определение капсульного варианта с помощью специфических антисывороток в реакции агглютинации на стекле, реакции латексной агглютинации и/или реакции набухания капсулы по Нейфельду. Этот метод основан на определении антигенных различий в строении капсульных полисахаридов *S. pneumoniae* с помощью типовых (групповых) антисывороток [13]. Именно серологический метод, оставаясь «золотым стандартом» типирования, позволяет дифференцировать пневмококки более чем на 90 различных серотипов.

Использование молекулярно-генетических методов исследования в клинической микробиологии позволило разработать альтернативный метод типирования *S. pneumoniae*, основанный на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Принцип молекулярного типирования базируется на том, что синтез полисахаридной капсулы контролируют гены, расположенные в локусе *cps*, центральная часть которого содержит серотипспецифические последовательности дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) [14]. На амплификации таких последовательностей основана дифференцировка серотипов с помощью ПЦР.

**Цель исследования:** сравнить результаты серологического и молекулярного методов типирования *S. pneumoniae* и оптимизировать схему мультиплексной ПЦР в соответствии с данными о циркулирующих в России серотипах.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Материал для исследования

В исследование включили штаммы *S. pneumoniae*, выделенные в период с 2009 по 2011 г. у детей в возрасте до 5 лет.

## Методы исследования

Для субкультивации *S. pneumoniae* использовали питательный агар Columbia с добавлением 3% донорской эритроцитарной массы крови человека и 3% лошадиной сыворотки. Инкубацию проводили в термостате с повышенным содержанием CO<sub>2</sub> (5%) при температуре 37°C в течение 24–48 ч.

Пневмококк идентифицировали на основании морфологических и культуральных свойств, а также с помощью оптохинового теста и реакции латекс-агглютинации с использованием набора Slidex Pneumo-Kit (BioMerieux, Франция). Серологическое типирование осуществляли после получения чистой культуры *S. pneumoniae*, для чего применяли наборы специфических пуловых, групповых и факторных сывороток и/или латексные диагностикумы (Statens Serum Institut, Дания) в реакциях латекс-агглютинации и/или набухания капсулы по Нейфельду. После серотипирования штаммы хранили в питательной среде с добавлением 17% стерильного глицерина при -80°C.

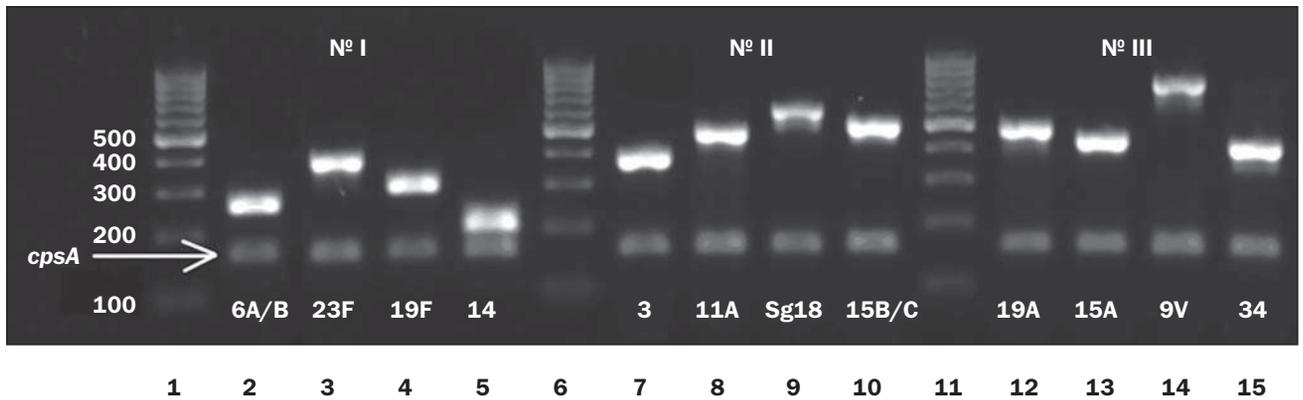
Для молекулярного типирования штаммы рекультивировали в течение 1 сут на кровяном агаре в указанных выше условиях. Для экстракции ДНК полученную культуру *S. pneumoniae* инокулировали в 250 мкл ТЕ-буфера состава 10 мМ Tris-HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0, и довели мутность бактериальной взвеси до 1 по стандарту МакФарланда. Затем микробную суспензию нагревали до 100°C в течение 5 мин, после чего немедленно замораживали. Полученные лизаты хранили до использования при -20°C.

Молекулярное типирование выполняли с помощью метода мультиплексной ПЦР (М-ПЦР), предложенного Pai и соавт. [10, 14]. Для этого 28 пар праймеров группировали в 7 М-ПЦР. В каждой ПЦР в качестве ДНК-матрицы использовали 2–3 мкл полученного бактериального экстракта. Реакционная смесь содержала 4 пары праймеров, нацеленных на серотипспецифические регионы ДНК 4 разных серотипов пневмококка, и включала внутренний положительный контроль — праймеры для локуса *cpsA*, которым обладают все пневмококки. Праймеры были сгруппированы в 7 М-ПЦР (табл. 1), за исключением серотипа 5, который не был включен ни в одну из этих реакций. Таким образом, последовательное проведение 7 М-ПЦР в указанном формате позволяет определить 28 серотипов *S. pneumoniae*. Идентификацию продуктов ПЦР проводили в 2% агарозном геле, окрашенном этидия бромидом, в ультрафиолетовом свете.

**Таблица 1.** Серотипы *S. pneumoniae*, определяемые в ходе мультиплексной полимеразной цепной реакции

№ ПЦР	Определяемые серотипы
I	6A/B, 14, 19F, 23F
II	3, 11A, 15B/C, Sg18
III	9V, 15A, 19A, 34
IV	1, 7F, 10A, 33F
V	4, 12F, 17F, 38
VI	7C, 16F, 35B, 35F
VII	8, 20, 31, 22F

Рис. 1. Репрезентативные результаты мультиплексного ПЦР-типирования *S. pneumoniae*



Примечание. Экстракты чистой культуры *S. pneumoniae* (источник бактериальной ДНК) смешивали с реакционной смесью для ПЦР, содержащей набор праймеров, специфичных для определенных серотипов. После амплификации продукты ПЦР подвергли электрофорезу в 2% агарозном геле. На рисунке представлены результаты мультиплексной ПЦР № I (линии 2–5), II (линии 7–10) и III (линии 12–15). Линии 1, 6, 11 — молекулярный стандарт. Стрелка указывает положение внутреннего положительного контроля *cpsA*. ПЦР — полимеразная цепная реакция.

трафиолетовом свете (рис. 1); их размер определяли путем сравнения с молекулярным стандартом (100 bp ladder). Исследователь, выполнявший ПЦР, не был информирован о результатах серотипирования, осуществленного классическим серологическим методом.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Всего в исследование включили 420 штаммов пневмококка, большинство из которых было выделено из назофарингеальных мазков, содержимого среднего

уха, мокроты, трахеального аспирата; 6 штаммов получили из стерильных локусов (спинномозговая жидкость, кровь).

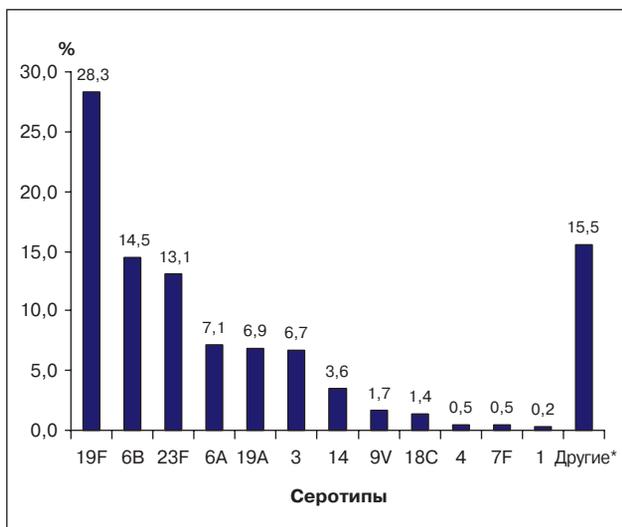
Серологическим методом серотип определили у всех 420 штаммов. Всего было идентифицировано 34 различных серотипа, среди которых доминировали 19F, 6A и 6B, 23F, 19A и 14 (рис. 2). В целом штаммы из числа серотипов, входящих в тринадцативалентную ПКВ, охватили 84,5% всего распределения.

Опираясь на полученные результаты, а также данные предыдущих исследований серотипового пейзажа *S. pneumoniae* на территории Российской Федерации [9, 10, 15–17], мы изменили состав наборов праймеров для ПЦР, рекомендованный Раи и соавт. [14], с учетом частоты встречаемости отдельных серотипов в нашей стране. Изменения были нацелены на то, чтобы охватить наибольшее число серотипов при проведении первых ПЦР и таким образом сократить число реакций, необходимых для типирования. В частности, композиция первых 3 ПЦР должна была обеспечить типирование 70–90% штаммов *S. pneumoniae* (см. табл. 1).

Результаты модифицированной М-ПЦР представлены в табл. 2. После постановки ПЦР № I удалось типировать 67% штаммов, ПЦР № II позволила типировать еще 14,4% штаммов, с помощью ПЦР № III дополнительно протипировали 8,6% изолятов, т.е. за первые 3 реакции было типировано 90% *S. pneumoniae* из нашей коллекции (см. табл. 2). С помощью ПЦР № IV–VII дополнительно типировали 5% штаммов, что в целом обеспечило использованной методике молекулярного типирования 95% покрытие серотипов.

Таким образом, 399 из 420 штаммов *S. pneumoniae* (95%) удалось типировать путем М-ПЦР. У оставшегося 21 штамма не удалось амплифицировать ни одного серотипспецифического продукта, хотя все эти изоляты дали положительный результат в ПЦР с праймерами для общего локуса *cpsA*, что указывало на их принадлежность к *S. pneumoniae*. Результаты серологического типирования показали, что все *cpsA*+-штаммы имели серотипы,

Рис. 2. Распределение (%) серотипов *S. pneumoniae* после серологического типирования с помощью специфических антисывороток ( $n = 420$ )



Примечание. Представлены серотипы из состава ПКВ13 в порядке убывания частоты. \*Другие — серотипы, не входящие в ПКВ13 ( $n = 65$ ). Распределение этих серотипов было следующим: 11A ( $n = 22$ ; 5,2%); 9N ( $n = 5$ ; 1,2%); 15B, 21 и 23A ( $n = 4$ ; 1,0% каждый); 15A, 16F и 31 ( $n = 3$ ; 0,7% каждый); 10A, 20 и 22 ( $n = 2$ ; 0,5% каждый); 2, 8, 10C, 10F, 13, 15F, 18F, 28F, 33B, 38 и 39 ( $n = 1$ ; 0,2% каждый).

которые не были включены ни в одну из М-ПЦР (см. примечание к табл. 2).

При сопоставлении серологического и молекулярного типирования *S. pneumoniae* обнаружено совпадение результатов у 396/399 (99,2%) изолятов. У 3 штаммов серологически был определен серотип 19А, а методом ПЦР — серотип 19F. При помощи мультилокусного сиквенс-типирования (MLST) установили, что 2 из этих штаммов относились к сиквенс-типу ST-8025 и 1 — к ST-5964, причем у ранее описанных штаммов из базы данных PMEN (<http://spneumoniae.mlst.net/>) указанные сиквенс-типы имели серотип 19А.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы оценили возможности молекулярного типирования *S. pneumoniae* по сравнению с классическим серологическим методом. Соотнесение состава М-ПЦР и определяемых в них серотипов с актуальным серотиповым пейзажем *S. pneumoniae* в Российской Федерации позволило добиться типирования 90% штаммов с помощью первых 3 ПЦР из мультиплексного набора. Фактически полное совпадение результатов двух способов типирования указывает на то, что молекулярное типирование — это надежный метод, который может быть использован в рутинной практике. Серологическое типирование, по-прежнему считающееся «золотым стандартом» дифференцировки пневмококков, обладает рядом недостатков (трудоемкость, высокая стоимость сывора, субъективизм при интерпретации результатов, повышенные требования к персоналу и тому подобное), что затрудняет его широкое использование в условиях дефицита кадров и недостаточного финансирования.

Недостатком использованного нами генетического метода в настоящее время является невозможность определения всех циркулирующих капсульных серотипов *S. pneumoniae*, а также дифференцировка серотипов в некоторых серогруппах [19, 22]. Например, серотипы 6А и 6В отличаются наличием единичного нуклеотидного полиморфизма в локусе *wsrP* гена *cps*, что делает невозможным их разделение с помощью простой ПЦР. Для их дифференциации необходимо применять другие методы, такие как пиросеквенирование [23]. В то же время предложенные ранее ПЦР-методики [17, 22] охватывают меньшее число включенных серотипов, поэтому содержат большой процент нетипируемых штаммов *S. pneumoniae*.

О разночтениях между результатами серологического и молекулярного типирования пневмококков, относящихся к серогруппе 19, сообщалось и ранее [18]. Штаммы *S. pneumoniae* серотипов 19А и 19F нередко имеют полифилетическую природу (т.е. несколько предшественников), что сопровождается повышенной вариабельностью *cps*-локусов, ответственных за синтез капсульных полисахаридов [19]. Высокая способность пневмококка к рекомбинации крупных фрагментов ДНК, которые могут включать и *cps*-локус, ведет к тому, что в естественных условиях случайным образом могут возникать субпопуляции бактерий с различными капсульными вариантами, которые имеют ограниченное распространение и не относятся к доминирующей популяции, в связи с чем их трудно идентифицировать. Однако селективное давление ПКВ

**Таблица 2.** Результаты молекулярного типирования *S. pneumoniae* с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции

№ ПЦР	Серотип/серогруппа	n	Накопленный %
I	6А/В	91 <sup>а</sup>	21,7
	14	15	25,2
	19F	122 <sup>б</sup>	54,3
	23F	55	<b>67,4</b>
II	3	28	74,0
	11А	22	79,3
	15В/С	3 <sup>в</sup>	80,0
	Sg18	7 <sup>г</sup>	<b>81,7</b>
III	9V	7	83,3
	15А	4	84,3
	19А	26	<b>90,5</b>
IV	1	1	90,7
	7F	2	91,2
	10А	2	<b>91,7</b>
V	4	2	92,1
	38	1	<b>92,4</b>
VI	16F	3	<b>93,1</b>
VII	8	1	93,3
	20	2	93,8
	31	3	94,5
	22F	2	<b>95,0</b>
	<i>cpsA+</i>	21 <sup>д</sup>	100,0
	<b>Всего:</b>	420	100

*Примечание.* По результатам серологического типирования (n): <sup>а</sup> 6А (30), 6В (61); <sup>б</sup> 19F (119), 19А (3); <sup>в</sup> 15В (3); <sup>г</sup> 18С (6), 18F (1); <sup>д</sup> 2 (1), 9N (5), 10С (1), 10F (1), 13 (1), 15F (1), 21 (4), 23А (4), 28F (1), 33В (1), 39 (1). *cpsA+*-штаммы — штаммы, у которых не удалось амплифицировать ни одного серотипспецифического продукта. Полуужирным шрифтом выделен накопленный процент идентифицированных штаммов после проведения М-ПЦР.

дает преимущество тем капсульным вариантам, которые не входят в состав вакцины. В этих условиях преобладающие небольшие клоны не-ПКВ-пневмококков могут разрастаться, начиная играть заметную роль в структуре серотипов. Полагают, что именно такой сценарий лежит в основе экспансии серотипа 19А, происходящего от клона серотипа 19F (Тайвань<sup>19F-14</sup>), на фоне вакцинации ПКВ7, в состав которой входит только серотип 19F [19, 20]. Интересно отметить, что феномен «переключения капсулы», т.е. приобретения нового капсульного полисахарида при сохранении «базового» генотипа, отмечали задолго до начала широкого использования антибиотиков и внедрения вакцинации [21], что позволяет считать такой тип рекомбинации неотъемлемой частью естественной эволюции пневмококка.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При помощи предложенной методики возможно идентифицировать более 90% циркулирующих неинвазив-

ных серотипов *S. pneumoniae* на территории Российской Федерации, а также все серотипы, включенные в состав существующих ПКВ. Это позволяет расценивать указанный метод как адекватную альтернативу классическому серологическому методу типирования пневмококка.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reinert R.R., Paradiso P., Fritzel B. Advances in pneumococcal vaccines: the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine received market authorization in Europe. *Exp. Rev. Vac.* 2010; 9: 229–236.
2. Катосова Л.К., Спичак Т.В., Ким С.С., Яцышина С.Б., Зубкова И.В., Прадед М.Н. *Вопр. диагностики в педиатрии.* 2009; 2: 27–31.
3. Сидоренко С.В., Лобзин Ю.В., Харит С.М., Королева И.С., Таточенко В.К. Пневмококковая инфекция и современные возможности ее профилактики — эпидемиологический обзор ситуации в мире и в России. *Вопр. совр. педиатрии.* 2010; 9 (1): 62–69.
4. McIntosh E.D., Reinert R.R. Global prevailing and emerging pediatric pneumococcal serotypes. *Exp. Rev. Vac.* 2011; 10 (1): 109–129. doi: 10.1586/erv.10.145.
5. Райнерт Р.Р., Тайши Б. Новые данные по эффективности 13-валентной пневмококковой конъюгированной вакцины в отношении инвазивных пневмококковых инфекций, пневмонии, острого среднего отита и назофарингеального носительства. *Педиатрич. фармакол.* 2012; 3: 12–18.
6. Rodgers G.L., Arguedas A., Cohen R., Dagan R. Global serotype distribution among *S. pneumoniae* isolates causing otitis media in children: potential implications for pneumococcal conjugate vaccines. *Vaccine.* 2009; 27: 3802–3810.
7. Rodgers G.L., Arguedas A., Cohen R., Dagan R. Global serotype distribution among *S. pneumoniae* isolates causing otitis media in children: potential implications for pneumococcal conjugate vaccines. *Vaccine.* 2009; 27: 3802–3810.
8. Маянский А.Н. Стрептококки: микробиология и патология. *Вопр. диагностики в педиатрии.* 2010; 1: 9–19.
9. Катосова Л.К., Таточенко В.К., Арова А.А., Кешикбаева А.А., Батуро А.П., Кузнецова Т.А., Левин А.Б. Серотипы *Streptococcus pneumoniae* у детей, больных острой пневмонией и плевритом. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1990; 5: 23–28.
10. Маянский Н.А., Алябьева Н.М., Катосова Л.К., Гречуха Т.А., Пинелис В.Г., Намазова-Баранова Л.С. Определение капсульных серотипов пневмококка методом мультиплексной ПЦР. *Вопр. диагностики в педиатрии.* 2010; 2 (6): 6–10.
11. Techasaensiri C., Messina A.F., Katz K., Ahmad N., Huang R., McCracken G.H., Jr. Epidemiology and evolution of invasive pneumococcal disease caused by multidrug resistant serotypes of 19A in the 8 years after implementation of pneumococcal conjugate vaccine immunization in Dallas, Texas. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2010; 29 (4): 294–300.
12. Miller E., Andrews N.J., Waight P.A., Slack M.P., George R.C. Herd immunity and serotype replacement 4 years after seven-valent pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales: an observational cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 2011; 11 (10): 760–768.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Часть исследования выполнена при поддержке гранта на проведение независимого исследования от компании Pfizer. Авторы выражают признательность врачам, приславшим образцы для исследования.

13. Konradsen H.B. Validation of serotyping of *Streptococcus pneumoniae* in Europe. *Vaccine.* 2005; 23: 1368–1373.
14. Pai R., Gertz R.E., Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 124–131.
15. Козлов Р.С., Чагарян А.Н., Козлова Л.В., Муравьев А.А. Серологическая характеристика и чувствительность к антибиотикам пневмококков, выделенных у детей в возрасте до 5 лет в отдельных регионах Российской Федерации. *Клин. микробиол. и антимикробн. тер.* 2011; 13 (2): 177–187.
16. Маянский Н.А., Алябьева Н.М., Иваненко А.М., Пономаренко О.А., Катосова Л.К., Лазарева А.В., Куличенко Т.В., Намазова-Баранова Л.С. Бактериальная этиология острого среднего отита у детей до 5 лет: роль *Streptococcus pneumoniae*. *Вопр. диагностики в педиатрии.* 2013; 5 (1): 5–13.
17. Боронина Л.Г., Саматова Е.В. Эпидемические особенности *Streptococcus pneumoniae*, выделенного у детей, при неинвазивных пневмококковых инфекциях и носоглоточном бактерионосительстве. *Вопр. диагностики в педиатрии.* 2013; 5 (1): 22–26.
18. Miernyk K., Debyle C., Harker-Jones M., Hummel K.B., Hennessy T. et al. Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* isolates from nasopharyngeal samples: use of an algorithm combining microbiologic, serologic, and sequential multiplex PCR techniques. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49: 3209–3214. doi: 10.1128/JCM.00610-11.
19. Croucher N.J., Harris S.R., Fraser C., Quail M.A., Burton J., van der Linden M., McGee L., von Gottberg A., Song J.H., Ko K.S. et al. Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. *Science.* 2011; 331 (6016): 331–434. doi: 10.1126/science.1198545.
20. Moore M.R., Gertz R.E., Jr, Woodbury R.L., Barkocsy-Gallagher G.A., Schaffner W., Lexau C. et al. Population snapshot of emergent *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in the United States, 2005. *J. Infect. Dis.* 2008; 197: 1016–1027. doi: 10.1086/528996.
21. Wyres K.L., Lambertsen L.M., Croucher N.J., McGee L., von Gottberg A., Linares J., Jacobs M.R., Kristinsson K.G., Beall B.W., Klugman K.P., Parkhill J., Hakenbeck R., Bentley S.D., Brueggemann A.B. Pneumococcal capsular switching: a historical perspective. *J. Infect. Dis.* 2013; 207 (3): 439–449.
22. Миронов К.О., Платонов А.Е., Козлов Р.С. Идентификация и серотипирование российских штаммов *Streptococcus pneumoniae* с применением методик, основанных на ПЦР. *Клин. микробиол. и антимикробн. тер.* 2011; 13 (4): 304–313.
23. Pai R., Limor J., Beall B. Use of pyrosequencing to differentiate *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6A and 6B. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43 (9): 4820–4822.