



Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

Учредитель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Издатель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии
www.iacmac.ru

Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати 30.09.1999 г. (№019273) Тираж 3000 экз.

Подписка на сайте издателя
<https://service.iacmac.ru>

Адрес для корреспонденции
214019, г. Смоленск, а/я 5.
Тел./факс: (4812)45 06 02

Электронная почта:
cmac@antibiotic.ru

Электронная версия журнала:
<https://cmac-journal.ru>

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование

Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов

Ответственность за достоверность рекламных публикаций несут рекламодатели

При перепечатке ссылка на журнал обязательна

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2022.

Содержание

Болезни и возбудители

- 4 Чеботарь И.В., Бочарова Ю.А.
Загадочный *Achromobacter*
- 14 Диникина Ю.В., Шагдилеева Е.В., Хостелиди С.Н., Шадривова О.В., Авдеенко Ю.Л., Волкова А.Г., Попова М.О., Зубаровская Л.С., Богомолова Т.С., Игнатъева С.М., Колбин А.С., Белогурова М.Б., Бойченко Э.Г., Клишко Н.Н.
Сочетание инвазивного аспергиллеза и мукормикоза у детей: описание клинического случая и результаты многоцентрового исследования

Антимикробные препараты

- 23 Гомон Ю.М., Колбин А.С.
Проблемы оценки экономической эффективности антимикробных препаратов: опыт Российской Федерации

Антибиотикорезистентность

- 31 Кузьменков А.Ю., Виноградова А.Г., Трушин И.В., Козлов Р.С.
Практика локального мониторинга антибиотикорезистентности в стационарах различных регионов РФ
- 39 Петрова Л.В., Кузьменков А.Ю., Камышова Д.А., Виноградова А.Г., Гусаров В.Г., Замятин М.Н.
Опыт внедрения онлайн-платформы AMRcloud для локального мониторинга антибиотикорезистентности в многопрофильном стационаре
- 47 Кожушная О.С., Солопова Г.Г., Маркелов М.И., Орил А.Р., Балашов Д.Н., Шелихова Л.Н., Новичкова Г.А.
Мониторинг мутаций в гене *UL97* цитомегаловируса, ассоциированных с резистентностью к ганцикловиру, у детей после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток
- 52 Эйдельштейн И.А., Руднева Н.С., Романов А.В., Зубарева Л.М., Кузьменков А.Ю., Колесникова Е.А., Трушин И.В., Борисов И.В., Суханова Л.Н., Ахмедова А.М., Новикова О.П., Козлов Р.С.
Mycoplasma genitalium: мониторинг распространения мутаций, связанных с резистентностью к макролидам в России

Микробиологическая диагностика

- 61 Чагарян А.Н., Иванчик Н.В., Миронов К.О., Муравьев А.А.
Современные методы капсульного типирования *Streptococcus pneumoniae*: возможности и доступность для практической лаборатории
- 67 Ивойлов О.О., Кочетов А.Г., Тирских К.А.
Современный подход к хронометражу рабочих мест микробиологической лаборатории

Опыт работы

- 77 Черкасова Ю.И., Кремлева Е.А., Щетинина Ю.С., Сгибнев А.В.
Влияние местного применения раствора, содержащего ионы железа двухвалентного, на эффективность терапии рецидивирующего урогенитального трихомониаза у женщин
- 83 Степанов Н.А., Рукоусева Т.В., Бочанова Е.Н., Боровлева А.В., Ганжа А.В., Носов А.С., Еремина К.И., Соболева В.О.
Оценка микробного загрязнения смартфонов медицинских работников

Современные методы капсульного типирования *Streptococcus pneumoniae*: возможности и доступность для практической лаборатории

Чагарян А.Н.¹, Иванчик Н.В.¹, Миронов К.О.², Муравьев А.А.¹

¹ НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России, Смоленск, Россия

² ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Контактный адрес:

Аида Нуримановна Чагарян

Эл. почта: Aida.Chagaryan@antibiotic.ru

Ключевые слова:

Streptococcus pneumoniae, cps-локус, серотипирование, серологические методы, ПЦР в режиме реального времени, полногеномное секвенирование.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Пневмококковые конъюгированные вакцины содержат ограниченное количество серотипов – специфических антигенов *S. pneumoniae*. Для мониторинга эффективности программ вакцинопрофилактики важно контролировать уровень разнообразия серотипов циркулирующих пневмококков. В данном обзоре приведен анализ подходов, используемых для серотипирования пневмококков, и определены дальнейшие направления совершенствования методов выявления пневмококковых серотипов при проведении микробиологического мониторинга. Использование серологических методов и методов мультиплексной ПЦР позволяет идентифицировать только ограниченное число серотипов. Подходы, основанные на полногеномном секвенировании, могут с высокой точностью предсказать почти все серотипы, определить сиквенс-типы, выявить гены антибиотикорезистентности и вирулентности.

Review

Current methods of capsular typing of *Streptococcus pneumoniae*: possibilities and availability for local laboratories

Chagaryan A.N.¹, Ivanchik N.V.¹, Mironov K.O.², Muravyev A.A.¹

¹ Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk, Russia

² Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Contacts:

Aida N. Chagaryan

E-mail: Aida.Chagaryan@antibiotic.ru

Key words:

Streptococcus pneumoniae, cps-locus, serotyping, serological methods, real-time PCR, whole genome sequencing.

Conflicts of interest: all authors report no conflicts of interest relevant to this article.

Pneumococcal conjugate vaccines contain a limited number of serotype-specific antigens of *S. pneumoniae*. It is important for vaccination programmes effectiveness assessment to control a variety of circulating *S. pneumoniae* serotypes. This review provides an analysis of pneumococcal serotyping approaches and further ways of improving pneumococcal serotype detection within the microbiological surveillance. Serological methods and multiplex PCR can identify a limited number of pneumococcal serotypes only. Whole-genome sequencing-based approaches can predict almost all serotypes and sequence types as well as detect antimicrobial resistance and virulence genes.

Введение

Streptococcus pneumoniae (пневмококк) является одним из важнейших возбудителей инфекций человека [1, 2]. Пневмококк продуцирует полисахаридную капсулу, которая обеспечивает защиту от фагоцитоза и является основным фактором вирулентности [3–5]. Синтез капсульного полисахарида осуществляется по одному из двух механизмов: синтаз-зависимому или Wzy-зависимому механизму. Все пневмококковые серотипы используют Wzy-зависимый механизм. Синтаз-

зависимый механизм используется при синтезе полисахарида только двумя серотипами – 3 и 37 [5, 6].

Полисахаридная капсула кодируется типоспецифическими генами, расположенными на хромосоме в cps-локусе, который находится между генами *dexB* и *aliA* (капсула серотипа 37 продуцируется геном *tts*, расположенным вне cps-локуса). Исходя из антигенных свойств полисахаридной капсулы, выделяют 46 серогрупп и более 100 серотипов пневмококка [6, 7]. Сравнительный

анализ *cps*-локуса пневмококка показал, что существует примерно 2000 кодирующих последовательностей, которые можно разделить на три функциональные группы: общие модулирующие гены (*wzg*, *wzh*, *wzd*, *wze*) на 5'-конце *cps*-локуса, которые определяют структуру полисахарида, серотип-специфические гены (состоящие в основном из различных гликозилтрансфераз и ацетилтрансфераз) и гены синтеза полисахарида, обычно обнаруживаемые на 3'-конце *cps*-локуса [5, 6, 8]. Получение капсульных генов от других пневмококков, а также от других стрептококков, таких как *Streptococcus mitis*, и потеря функции генов, возможно, стали причиной появления новых серотипов [9, 10].

Пневмококковые конъюгированные вакцины содержат до 15 серотипов (специфических антигенов) *S. pneumoniae*. Пневмококки этих серотипов, по данным эпидемиологических исследований, в различных странах мира вызывают до 90% инвазивных инфекций у взрослых и детей. Поэтому для мониторинга эффективности программ вакцинопрофилактики важно понимать и контролировать уровень разнообразия серотипов циркулирующих пневмококков, т.к. замена «вакцинных» клонов может потенциально привести к увеличению количества входящих в состав вакцин и редко встречавшихся ранее серотипов [11, 12].

Для определения серотипов пневмококков могут использоваться серологические методы и молекулярно-биологические методы, основанные на ПЦР и секвенировании.

Серологические методы

К серологическим методам относят реакции набухания капсулы или латекс-агглютинации, например, с помощью факторных антисывороток – набора реагентов «Pneumotest-Latex», разработанных Институтом сывороток (Statens Serum Institut, Дания) [13, 14].

Тест на капсульную реакцию, известный как реакция Квеллунга, впервые был описан Нойфельдом в 1902 г. В настоящее время реакция Квеллунга позволяет идентифицировать 92 серотипа пневмококка [15–17].

Разработка тестов с использованием латекс-агглютинации сокращает время проведения анализа. Реакция агглютинации, которая происходит между пневмококком и типоспецифическими антителами в сыворотке, визуализируема и не требует микроскопии, т.к. в результате реакции происходит образование видимых хлопьев. Метод агглютинации для серотипирования пневмококков по принципу шахматной доски был введен в 1993 г. и послужил основой для «Pneumotest-Latex» теста [15, 18–20], который позволяет определить 23 серотипа пневмококка, входящих в пневмококковую полисахаридную вакцину.

Несмотря на широкое использование, в ряде случаев возникают трудности при интерпретации результатов серологических методов, поскольку серотипы одной серогруппы могут перекрестно реагировать с некоторыми антисыворотками, что не всегда позволяет однозначно определить серотип. Ограничения серологичес-

ких методов заключаются в том, что они неудобны для серотипирования большого количества изолятов, являются относительно трудоемкими, дорогостоящими и имеют ограниченную доступность.

Мультиплексная ПЦР

После того как в 2006 г. Институтом Сэнгера (Великобритания) были секвенированы *cps*-локусы 90 серотипов пневмококка, появилась возможность для серотипирования *S. pneumoniae* с использованием методик, основанных на ПЦР [21–24]. Первые рекомендованные методики предполагали постановку ПЦР с электрофоретическим разделением продуктов амплификации в агарозном геле (ПЦР-ЭФ) [25]. Праймеры были сгруппированы в 7 реакций на основе данных по распределению наиболее часто встречающихся серотипов среди инвазивных пневмококков, обнаруженных в США. Каждая мультиплексная реакция включала 4 пары праймеров, нацеленных на серотип-специфические области четырех различных серотипов, а также положительный внутренний контроль для амплификации фрагмента *cps*-локуса, общего для всех серотипов с праймерами *cpsA-f* и *cpsA-r* [25].

В отечественной эпидемиологической практике была использована модифицированная методика [28], в которой праймеры для детекции серотип-специфических мишеней были распределены по четырем ПЦР-смесям, три из которых содержали 6 и одна 5 серотип-специфических пар праймеров, предложенных Pai R. и соавт. [25]. Цель создания модифицированной методики заключалась в оптимизации проведения исследования за счет сокращения количества реакций, необходимых для определения серотипа, и использования в анализе серотип-специфических мишеней с учетом данных о серотиповом составе возбудителей пневмококковых инфекций, циркулирующих в России [28].

Недостатками методик, основанных на ПЦР-ЭФ, являются относительная трудоемкость и неодинаковая чувствительность для серотип-специфических мишеней, обусловленная необходимостью проведения амплификации последовательностей разной длины, что выступает необходимым условием их последующего разделения в агарозном геле.

Использование ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РПВ) позволяет упростить процедуру детекции продуктов амплификации и повысить чувствительность исследования.

В 2009 г. Центрами США по контролю и профилактике заболеваний (CDC) были рекомендованы протоколы для серотипирования изолятов пневмококка и клинических образцов с использованием ПЦР для определения 40 серотип-специфических мишеней, в основе которых лежит работа Pai R. и соавт. [25, 26]. Эти протоколы были разработаны для стран Америки и Африки с учетом серотипового состава возбудителей пневмококковых инфекций в этих странах.

Алгоритм исследования по серотипированию *S. pneumoniae* разрабатывается с учетом особенностей

региона (циркулирующих серотипов, серотипов, входящих в используемые вакцины), в котором проводится мониторинг.

В РФ одной из первых методик, основанных на ПЦР-PPV с учетом рекомендаций CDC, являлась методика, разработанная в Центральном НИИ эпидемиологии (Москва). Она заключалась в последовательном проведении четырех реакций в приборах с пятью каналами флуоресцентной детекции: каждая реакционная смесь содержала по 4 серотип-специфические мишени и положительный внутренний контроль [28, 29]. Методики ПЦР-PPV были использованы в ряде работ по характеристике российских пневмококков [28–33].

Мультиплексная ПЦР позволяет оперативно выполнять скрининг партий пневмококков, а также одновременно проводить детекцию *S. pneumoniae* и определение типа капсулы непосредственно в клинических образцах, без предварительного культивирования.

Высокая гомология последовательностей *cps*-локусов у серотипов, относящихся к одной и той же серогруппе, является препятствием для разработки серотип-специфических праймеров. Например, пара праймеров 6A/6B/6C/6D-f и 6A/6B/6C/6D-r [26] в одной реакции одновременно специфична как минимум к четырем различным серотипам. Небольшие генетические вариации в *cps*-локусе у некоторых изолятов могут приводить к ложноотрицательным результатам.

Основанные на ПЦР методики охватывают ограниченное число серотипов, что обуславливает определенную долю нетипируемых штаммов *S. pneumoniae* [27–31]. Нередко *S. pneumoniae* путают с другими видами рода *Streptococcus* из-за их высокой степени сходства, особенно с *S. pseudopneumoniae* [34]. Использование положительного внутреннего контроля позволяет дифференцировать *S. pneumoniae* и *S. pseudopneumoniae* или *S. mitis*. Однако некоторые серотипы могут быть отрицательными по этой мишени из-за неспецифической амплификации. В целом из-за высокой частоты рекомбинаций между стрептококками возможны как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты ПЦР-идентификации [26].

Полногеномное секвенирование

Серотипирование на основе полногеномной последовательности имеет дополнительное преимущество, которое заключается в том, что предположительно новые серотипы могут быть идентифицированы непосредственно по геномной последовательности. Методы, основанные на полногеномных последовательностях, зависят от наличия охарактеризованных референсных последовательностей *cps*-локусов, с помощью которых можно разработать метод тестирования и обеспечить точное предсказание серотипа. Степень вариабельности исходных эталонных последовательностей 90 *cps*-локусов [5] для отдельных серотипов неизвестна (в отличие от серогрупп). Появление вариантов *cps*-локусов может быть обусловлено использованием вакцин. В то же время

селективное давление, обусловленное вакцинацией, может привести к увеличению количества невакцинных серотипов в популяции, что в свою очередь может повлиять на общую эффективность вакцинации [35, 36]. Именно поэтому новые серотипы, появляющиеся и распространяющиеся в популяции, требуют постоянного (непрерывного) изучения.

Анализ полногеномной ДНК становится все более распространенным и является эффективным методом определения серотипов пневмококков в чистых изолятах. Из-за сложности капсульных локусов пневмококка текущее программное обеспечение для анализа требует, чтобы исследуемые образцы были чистыми и содержали только один серотип пневмококка.

Для определения серотипов *S. pneumoniae* используются программы PneumoCaT и SeroVA [37, 38]. PneumoCaT – это программа для прогнозирования типа капсулы по данным полногеномного секвенирования, представляющая собой базу данных вариантов капсульных типов пневмококка, а также дополнительную информацию об аллелях, генах для серотипов внутри определенных серогрупп [38]. PneumoCaT может использоваться для фенотипического анализа потенциально новых серотипов.

SeroVA может предсказать серотипы, идентифицируя *cps*-локус непосредственно из необработанных данных чтения полного секвенирования генома с 98% конкордантностью. Одним из основных источников ошибок являются образцы с мозаичными серотипами. Известно, что небольшие изменения генов в *cps*-локусе могут приводить к изменениям в структуре полисахаридов: например, отдельные аминокислотные изменения в гене *wciP* серогруппы 6 приводят к разным полисахаридам серотипов 6A и 6B, но аналогичные генетические различия между серотипами 6B и 6Bii (6E) не приводят к различию в полисахаридах [39]. У изолятов серогруппы 6 *cps*-локусы представляют собой мозаичную структуру, происходящую от разных доноров [40]. В ряде серотипов, таких как 9A, 22A и 33F, различия между полисахаридными капсулами, продуцируемыми похожими *cps*-локусами (например, 9V, 22F и 33A), обусловлены сдвигом рамки считывания в генах на 3'-конце *cps*-локуса, например генах *gct* и *wcjE* [6, 41].

SeroVA не может автоматически обнаруживать мозаичные серотипы, но их можно идентифицировать вручную, проверяя сборки, предоставленные SeroVA. Сборки последовательности *cps*-локуса, представленные SeroVA, можно использовать для выявления новых мутаций внутри серогруппы или для исследования эволюции *cps*-локуса *S. pneumoniae*.

Таким образом, методы полногеномного секвенирования имеют ограничения, связанные с трудностью определения серотипов возбудителя в биологических образцах, являются длительными, трудоемкими и требуют дорогостоящего оборудования.

Вся подробная информация о геномах пневмококка содержится в базе данных PubMLST [42], включая данные об оценке качества сборки полногеномных последовательностей секвенированных штаммов. В настоящий

момент PubMLST содержит результаты типирования порядка 73 тыс. изолятов, включая более 37 тыс. геномов *S. pneumoniae*, из которых 288 полногеномные последовательности российских изолятов [32, 43].

Применение высокопроизводительного секвенирования позволяет получить исчерпывающую характеристику микроорганизмов на основании анализа их полногеномных сиквенсов – последовательностей генов *src*-локуса для определения серотипов и данных о первичных последовательностях локусов «основного генома» (core genome), анализ которых обладает максимальной дискриминирующей способностью для определения генетических взаимоотношений штаммов и определения клональной структуры бактериальной популяции. Накопление и анализ полногеномных данных в перспективе позволит расширить представления об основных генетических вариациях, ассоциированных со способностью отдельных представителей вида *S. pneumoniae* вызывать инвазивные формы пневмококковых инфекций [33]. Существенным ограничением широкого использования полногеномного секвенирования является высокая стоимость. В настоящее время развивающиеся технологии – разработка методов деплеции с

целью прямого секвенирования из клинических образцов, секвенирование только интересующих областей, – снижают затраты на секвенирование при одновременном увеличении охвата выбранных целей.

Заключение

Используемые на сегодняшний день серологические методы и методы мультиплексной ПЦР могут идентифицировать только ограниченное число серотипов. Подходы, основанные на полногеномном секвенировании, могут с высокой точностью предсказать почти все серотипы, определить сиквенс-типы, выявить гены антибиотикорезистентности и вирулентности. Таким образом, при проведении мониторинга циркулирующих серотипов *S. pneumoniae* наиболее оптимальным для практических лабораторий является использование комплекса методов, основанных на ПЦР-PPV, для рутинного серотипирования на местах и последующей расшифровки нетипируемых изолятов с помощью полногеномного секвенирования, что дает возможность получать исчерпывающие данные об антигенных и генетических свойствах возбудителей [32].

Литература

1. Antibiotic resistance threats in the United States. Available at: www.cdc.gov/DrugResistance/Biggest-Threats.html. Accessed Nov 2021.
2. GBD 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the global burden of disease study 2016. *Lancet Infect Dis.* 2018;18:1191-1210. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30310-4
3. Briles D.E., Crain M.J., Gray B.M., Forman C., Yother J. Strong association between capsular type and virulence for mice among human isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 1992;60:111-116. DOI: 10.1128/iai.60.1.111-116.1992
4. Larson T.R., Yother J. *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide is linked to peptidoglycan via a direct glycosidic bond to beta-D-N-acetylglucosamine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114:5695-5700. DOI: 10.1073/pnas.1620431114
5. Bentley S.D., Aanensen D.M., Mavroidi A., Saunders D., Rabinowitch E., Collins M., et al. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet.* 2006;2:e31. DOI: 10.1371/journal.pgen.0020031
6. Geno K.A., Gilbert G.L., Song J.Y., Skovsted I.C., Klugman K.P., Jones C., et al. Pneumococcal capsules and their types: past, present, and future. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):871-899. DOI: 10.1128/CMR.00024-15
7. Calix J.J., Porambo R.J., Brady A.M., Larson T.R., Yother J., Abeygunwardana C., et al. Biochemical, genetic, and serological characterization of two capsule subtypes among *Streptococcus pneumoniae* serotype 20 strains: discovery of a new pneumococcal serotype. *J Biol Chem.* 2012;287:27885-27894. DOI: 10.1074/jbc.M112.380451
8. Yother J. Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. *Annu Rev Microbiol.* 2011;65:563-581. DOI: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162944
9. Aanensen D.M., Mavroidi A., Bentley S.D., Reeves P.R., Spratt B.G. Predicted functions and linkage specificities of the products of the *Streptococcus pneumoniae* capsular biosynthetic loci. *J Bacteriol.* 2007;189:7856-7876. DOI: 10.1128/JB.00837-07
10. Mavroidi A., Aanensen D.M., Godoy D., Skovsted I.C., Kalsoft M.S., Reeves P.R., et al. Genetic relatedness of the *Streptococcus pneumoniae* capsular biosynthetic loci. *J Bacteriol.* 2007;189:7841-7855. DOI: 10.1128/JB.00836-07
11. Mayansky N.A., Alyabyeva N.M., Katosova L.K., Grechukha T.A., Pinelis V.G., Namazova-Baranova L.S. Determination of pneumococcal capsular serotypes by multiplex PCR. *Questions of diagnostics in pediatrics.* 2010;2(6):6-12. Russian. (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. *Вопросы диагностики в педиатрии.* 2010;2(6):6-12.)
12. Miller E., Andrews N.J., Waight P.A., Slack M.P., Geo-

- rgе R.C. Herd immunity and serotype replacement 4 years after sevenvalent pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2011;11(10):760-768. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70090-1
13. Jauneikaite E., Tocheva A.S., Jefferies J.M.C., Gladstone R.A., Faust S.N., Christodoulides M., et al. Current methods for capsular typing of *Streptococcus pneumoniae*. *J Microbiol Methods.* 2015;113:41-49. DOI: 10.1016/j.mimet.2015.03.006
 14. Sørensen U.B. Typing of pneumococci by using 12-pooled antisera. *J Clin Microbiol.* 1993;31(8):2097-2100. DOI: 10.1128/jcm.31.8.2097-2100.1993
 15. Austrian R. The quellung reaction, a neglected microbiologic technique. *Mt Sinai J Med.* 1976;43(6):699-709. PMID: 13297
 16. Porter B.D., Ortika B.D., Satzke C. Capsular Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* by latex agglutination video link. *J Vis Exp.* 2014;91:e2477. DOI: 10.3791/51747
 17. Habib M., Porter B.D., Satzke C. Capsular serotyping of *Streptococcus pneumoniae* using the quellung reaction video link. *J Vis Exp.* 2014;84:e2477. DOI: 10.3791/51208
 18. SSI Diagnostica. *Streptococcus pneumoniae*: textbook in diagnosis, serotyping, virulence factors and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring pneumococcal antibodies. Available at: www.oxfordbiosystems.com/Portals/0/PDF/Microbiology/SSI%20Book%20Streptococcus%20pneumonia.pdf. Accessed February 2021.
 19. SSI Diagnostica. Neufeld Test (Quellung reaction). Available at: www.oxfordbiosystems.com/Portals/0/PDF/Microbiology/SSI%20Book%20Streptococcus%20pneumonia.pdf. Accessed February 2021.
 20. SSI Diagnostica. Key to *S. pneumoniae* Types and Pneumococcal Diagnostic Antisera. Available at: www.oxfordbiosystems.com/Portals/0/PDF/Microbiology/SSI%20Book%20Streptococcus%20pneumonia.pdf. Accessed February 2021.
 21. Shakrin N.N.S.M., Balasubramaniam S.D., Yusof H.A., Mastuki M.F., Masri S.N. Taib N.M., et al. Evaluation of PCR-based approach for serotype determination of *Streptococcus pneumoniae*. *Trop Biomed.* 2013;30(2):338-344. PMID: 23959499
 22. Siira L., Kaijalainen T., Lambertsen L., Nahm M.H., Toropainen M., Virolainen A. From Quellung to multiplex PCR, and back when needed, in pneumococcal serotyping. *J Clin Microbiol.* 2012;50(8):2727-2731. DOI: 10.1128/JCM.00689-12
 23. Slinger R., Hyde L., Moldovan I., Chan F., Pernica J.M. Direct *Streptococcus pneumoniae* real-time PCR serotyping from pediatric parapneumonic effusions. *BMC Pediatr.* 2014;14:189. DOI: 10.1186/1471-2431-14-189
 24. Yu J., Lin J., Kim K.-H., Benjamin W.H., Nahm M.H. Development of an automated and multiplexed serotyping assay for *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(11):1900-1907. DOI: 10.1128/0162-1225.01100-11
 25. 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. DOI: 10.1128/JCM.44.1.124-131.2006
 26. Conventional PCR deduction of 40 pneumococcal serotypes or serogroups. Available at: www.cdc.gov/streplab/pcr.html. Accessed February 2021.
 27. Mauffrey F., Fournier E., Demczuk W., Martin I., Mulvey M., Martineau C., et al. Comparison of sequential multiplex PCR, sequencing and whole genome sequencing for serotyping of *Streptococcus pneumoniae*. 2017;12(12):e0189163. DOI: 10.1371/journal.pone.0189163
 28. Mironov K.O., Platonov A.E., Kozlov R.S. Identification and serotyping of Russian strains of *Streptococcus pneumoniae* by PCR method. *Kliniceskaa mikrobiologia i antimikrobnaya himioterapia.* 2011;13(4):304-313. Russian. (Миронов К.О., Платонов А.Е., Козлов Р.С. Идентификация и серотипирование российских штаммов *Streptococcus pneumoniae* методом ПЦР. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2011;13(4):304-313.)
 29. Mironov K.O., Platonov A.E., Dunaeva E.A., Kuseva V.I., Shipulin G.A. Real-time PCR procedure for determination of *Streptococcus pneumoniae* serotypes. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2014;91(1):41-48. Russian. (Миронов К.О., Платонов А.Е., Дунаева Е.А., Кусева В.И., Шипулин Г.А. Методика ПЦР в режиме реального времени для определения серотипов *Streptococcus pneumoniae*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2014;91(1):41-48.)
 30. Sidorenko S., Rennert W., Lobzin Y, Briko N., Kozlov R., Namazova-Baranova L., et al. Multicenter study of serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal isolates from healthy children in the Russian Federation after introduction of PCV13 into the National Vaccination Calendar. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2020;96(1):114914. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.114914
 31. Muravyov A.A., Chagaryan A.N., Ivanchik N.V., Kurkova A.A., Tsvetkova I.A., Kozlov R.S., et al. Epidemiology of *S. pneumoniae* serotypes isolated from persons over 18 years of age: healthy carriers, patients with acute otitis media, community-acquired pneumonia and invasive pneumococcal infection ("SPECTRUM" study). *Kliniceskaa mikrobiologia i antimikrobnaya himioterapia.* 2019;21(4):275-281. Russian. (Муравьев А.А., Чагарян А.Н., Иванчик Н.В., Куркова А.А., Цветкова И.А., Козлов Р.С. и соавт. Эпидемиология серотипов *S. pneumoniae*, выделенных у лиц старше 18 лет: здоровых носителей, пациентов с острым средним отитом, внебольничной пневмонией и инвазивной пневмококковой инфекцией (исследование «SPECTRUM»). *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2019;21(4):275-281.) DOI: 10.36488/смас.2019.4.275-281
 32. Mironov K.O., Korchagin V.I., Mikhaylova Yu.V., Yanushevich Yu.G., Shelentov A.A., Chagaryan A.N., et al. Characterization of *Streptococcus pneumoniae* strains causing invasive infections using whole-genome sequencing. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.*

- 2020;97(2):113-118. Russian. (Миронов К.О., Корчагин В.И., Михайлова Ю.В., Янушевич Ю.Г., Шеленков А.А., Чагарян А.Н. и соавт. Характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных инвазивными пневмококковыми инфекциями, с использованием высокопроизводительного секвенирования. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2020;97(2):113-118.) DOI: 10.36233/0372-9311-2020-97-2-113-118
33. Mironov K.O., Gaponova I.I., Korchagin V.I., Mihailova Y.V., Shelenkov A.A., Kaptelova V.V., et al. Antigenic and genetic characterization of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from patients with invasive and non-invasive pneumococcal infections by using high-throughput sequencing. Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii. 2021;98(5):512-518. Russian (Миронов К.О., Гапонова И.И., Корчагин В.И., Михайлова Ю.В., Шеленков А.А., Каптелова В.В. и соавт. Антигенная и генетическая характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных инвазивными и неинвазивными пневмококковыми инфекциями, с использованием высокопроизводительного секвенирования. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2021;98(5):512-518.) DOI: 10.36233/0372-9311-144
34. Carvalho M.D.G., Pimenta F.C., Moura I., Roundtree A., Gertz R.E., Li Z., et al. Non-pneumococcal mitis-group streptococci confound detection of pneumococcal capsular serotype-specific loci in upper respiratory tract. PeerJ. 2013;1:e97. DOI: 10.7717/peerj.97
35. Wyres L., Lambertsen M. et al. Pneumococcal capsular switching: a historical perspective. J Infect Dis. 2013;207(3):439-449. DOI: 10.1093/infdis/jis703
36. Tonder A., Gladstone R., Lo S. Putative novel *cps* loci in a large global collection of pneumococci. Microb Genom. 2019;5(7):e000274. DOI: 10.1099/mgen.0.000274
37. Epping L., van Tonder A.J., Gladstone R.A., Bentley S.D., Page A.J., Keane J.A. The Global Pneumococcal Sequencing Consortium. SeroBA: rapid high-throughput serotyping of *Streptococcus pneumoniae* from whole genome sequence data. Microb Genom. 2018;4(7):e000186. DOI: 10.1099/mgen.0.000186
38. Kapatai G., Sheppard C.L., Al-Shahib A., Litt D.J., Underwood A.P., Harrison T.G., et al. Whole genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*: development, evaluation and verification of targets for serogroup and serotype prediction using an automated pipeline. PeerJ. 2016;4:e2477. DOI: doi.org/10.7717/peerj.2477
39. Croucher N.J., Harris S.R., Fraser C., Quail M.A., Burton J., van der Linden M., et al. Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. Science. 2011;331(6016):331-434. DOI: 10.1126/science.1198545
40. Song J.-H., Baek J.Y., Ko K.S. Comparison of capsular genes of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6A, 6B, 6C, and 6D isolates. J Clin Microbiol. 2011;49(5):1758-1764. DOI: 10.1128/JCM.02628-10
41. Xayarath B., Yother J. Mutations blocking side chain assembly, polymerization, or transport of a Wzy-dependent *Streptococcus pneumoniae* capsule are lethal in the absence of suppressor mutations and can affect polymer transfer to the cell wall. J Bacteriol. 2007;189:3369-3381. DOI: 10.1128/JB.01938-06
42. *Streptococcus pneumoniae* MLST Databases. Available at: <https://pubmlst.org/spneumoniae/>. Accessed February 2021.
43. Gladstone R.A., Lo S.W., Lees J.A., Croucher N.J., van Tonder A.J., Corander J., et al. International genomic definition of pneumococcal lineages, to contextualise disease, antibiotic resistance and vaccine impact. EBioMedicine. 2019;43:338-346. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.04.021