

МУЛЬТИЛОКУСНОЕ СИКВЕНСТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ У ПАЦИЕНТОВ ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА С ВНЕБОЛЬНИЧНЫМИ ПНЕВМОНИЯМИ

Мартынова А.В.^{1,2}, Балабанова Л.А.³, Чулакова О.А.¹

¹ Тихоокеанский государственный медицинский университет, г. Владивосток

² Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток

³ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, г. Владивосток

РЕЗЮМЕ

Внебольничные пневмонии у лиц пожилого возраста являются значимой эпидемиологической проблемой для здравоохранения практически всех стран. Особенно актуальна проблема микробиологического мониторинга и эпидемиологического надзора за штаммами *Streptococcus pneumoniae*, как одного из убиквитарных возбудителей, вызывающих внебольничные пневмонии и другие инфекции дыхательных путей различной степени тяжести, что определяется их различной эпидемиологической значимостью.

Мультилокусное сиквенстипирование – перспективный метод молекулярно-эпидемиологического мониторинга, позволяющего идентифицировать эпидемиологически опасные клоны *S. pneumoniae*. Целью исследования являлось проведение мультилокусного сиквенстипирования штаммов пневмококка, выделенных у пациентов с внебольничными пневмониями, бронхитами и у носителей пожилого возраста.

Материал и методы. Было проведено исследование 14 штаммов, выделенных у пациентов с внебольничными пневмониями (из них 7 полирезистентных), 8 штаммов от пациентов с хронической обструктивной болезнью легких, 4 штамма от носителей. Мультилокусное сиквенстипирование было проведено согласно методике М.С. Enright и В.С. Spratt (1998).

Результаты. Все штаммы, выделенные в трех популяциях, представляют собой родственные изоляты вида *S. pneumoniae*, большинство из которых (18 из 26) обладают уникальным генотипом, определяющим наличие одного сиквенстипа 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, превалирования какого-либо генотипа не выявлено.

Заключение. Мультилокусное сиквенстипирование позволяет идентифицировать новые генотипы и дать прогноз относительно появления эпидемиологически опасных штаммов с новыми свойствами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мультилокусное сиквенстипирование, пневмококковые пневмонии, внебольничные пневмонии, *S. pneumoniae*.

Введение

Несмотря на пристальное внимание к проблеме инфекций дыхательных путей, внебольничные пневмонии являются актуальнейшей проблемой современной медицины. Особенно важна эта проблема среди лиц пожилого возраста [1–3]. Установлено, что рас-

пространенность внебольничных пневмоний среди лиц пожилого и старческого возраста в России составляет 16,1%, а в США – 20–40%. По данным американских и европейских врачей, 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. Летальность при пневмонии среди больных старше 60 лет в 10 раз выше, чем в

✉ Мартынова А.В., тел. 8-914-701-6908; e-mail: clinmicro@yandex.ru

других возрастных группах, и достигает 10–15% при пневмококковых пневмониях [4]. Учитывая тот факт, что *Streptococcus pneumoniae* – один из основных возбудителей внебольничных пневмоний в других возрастных группах, а носительство этого возбудителя чрезвычайно распространено, значимость эпидемиологических исследований в отношении именно пневмококковых пневмоний у лиц пожилого возраста представляется более чем актуальной [5–7].

Основными проблемами, наиболее значимыми в практическом здравоохранении и требующими практической доработки, в отношении пневмококковых пневмоний у пожилых лиц являются организация контроля за распространением антибиотикорезистентных изолятов, а также молекулярно-эпидемиологический мониторинг выделяемых изолятов, основанный на генотипировании, так как именно он позволит получить стандартизованную информацию о распространении того или иного изолята, что даст возможность сравнивать полученную информацию о характере выявляемых штаммов *S. pneumoniae*, и, соответственно, планировать профилактические мероприятия в отношении пневмококковой инфекции.

Одним из методов, предназначенных для молекулярно-эпидемиологического мониторинга, является мультилокусное сиквенстипирование (MLST). Этот метод является более дискриминирующим и основан на исследовании вариабельности фрагментов (по 500 кб) 7 пар аллельных генов пневмококка. Он позволяет создать фактически индивидуальный аллельный профиль каждого штамма, и в том числе охарактеризовать эпидемическую значимость штаммов пневмококка в развитии внебольничной пневмонии [8].

Цель исследования – выявить при помощи метода мультилокусного сиквенстипирования распространение эпидемически значимых штаммов *Streptococcus pneumoniae* у пациентов пожилого возраста с внебольничной пневмонией и определить доминирующий генотип.

Материал и методы

Для проведения исследования было обследовано 300 больных (средний возраст $(69 \pm 6,7)$ года), находящихся на стационарном лечении с диагнозом «внебольничная пневмония» в Главном Госпитале Ветеранов, из которых 118 внебольничных пневмоний были пневмониями пневмококковой этиологии.

Для выявления роли носительства пневмококков в формировании заболеваемости у лиц пожилого возраста инфекциями нижних дыхательных путей проведено обследование 100 пациентов, обратив-

шихся за консультативной медицинской помощью в поликлинику ветеранов по поводу заболеваний желудочно-кишечного тракта, травм и не имеющих хронических заболеваний дыхательных путей в анам-

незе, острых заболеваний дыхательных путей на момент обследования. Средний возраст пациентов составил $(72 \pm 5,6)$ года. У них было выделено 29 штаммов *S. pneumoniae*.

Кроме того, мы исследовали 78 штаммов пневмококка, выделенных от 500 пациентов (средний возраст $(65 \pm 7,8)$ года), находящихся на лечении с диагнозом «острый бронхит» (согласно МКБ-10 – J40), «простой и слизисто-гнойный бронхит» (J41), «смешанный, простой и слизисто-гнойный хронический бронхит» (J41.1, J41.8), прежде всего исходя из той концепции, что несмотря на то, что пневмококк является по сути своей убиквитарным, т.е. широко распространенным, и при носительстве тоже, микроорганизмом, в силу определенных триггерных обстоятельств экспрессия его факторов патогенности может меняться в сторону большей агрессии, что приведет к развитию пневмонии. В связи с этим, на наш взгляд, включение этих штаммов в исследование было вызвано намерением показать наличие динамики нарастания экспрессии факторов патогенности для того, чтобы продемонстрировать как именно изменяется экспрессия факторов патогенности штаммов в соответствии с уровнем патогенетического процесса и, соответственно, с выраженностью инфекционного процесса у пациента.

Далее выделенные штаммы были изучены диско-диффузионным методом на антибиотикорезистентность к пенициллину, эритромицину, тетрациклину, цефалоспоринолу, азитромицину [5].

Учитывая тот факт, что одной из наиболее значимых эпидемических характеристик является устойчивость к антибактериальным химиопрепаратам, и в том числе полирезистентность, то в исследование были включены полирезистентные (всего 13) и в равном им количестве взятые штаммы пневмококка, выделенные от пациентов пожилого возраста с внебольничными пневмониями (1-я группа, 14 штаммов, из которых 7 были полирезистентными и 7 – чувствительными к антибиотикам). В качестве контроля были взяты полирезистентные штаммы, выделенные от пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (2-я группа, 8 штаммов, поровну чувствительных и полирезистентных) и от носителей (3-я группа, 4 штамма). Под полирезистентностью понимали устойчивость штаммов пневмококка к пенициллину и эритромицину. В связи с поставленной целью исследования выборка является

репрезентативной, так как отражает распространенность полирезистентных штаммов.

Мультилокусное сиквенстипирование было проведено согласно методике М.С. Enright и В.Г. Spratt (1998) [8]. Праймеры, использованные в исследовании, могут быть представлены следующим образом (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Праймеры, используемые в мультилокусном сиквенстипировании		
Праймеры	Последовательность	Длина амплифицируемого фрагмента (пар оснований)
<i>aroE</i> -up	5'-GCC TTT GAG GCG ACA GC	405
<i>aroE</i> -dn	5'-TGC AGT TCAAAA ACA TAT TCT	
<i>ddl</i> -up	5' TGCC/TCAAGTTCCTTATGTGG	441
<i>ddl</i> -dn	5' CACTGGGTG/ AAAACCA/TGGCAT	
<i>gdh</i> -up	5' ATGGACAAACCAGCNAAGC/ TTT	459
<i>gdh</i> -dn	5' GCTTGAGGTCCCATG/ACTNCC	
<i>gki</i> -up	5' GGCATTGGAATGGGATCACC	483
<i>gki</i> -dn	5' TCTCCCGCAGCTGACAC	
<i>recP</i> -up	5' GCCAACTCAGGTCATCCAGG	448
<i>recP</i> -dn	5' TGCAACCGTAGCATTGTAAC	
<i>spi</i> -up	5' TTATTCCTCCTGATTCTGTGTC	472
<i>spi</i> -dn	5' GTGATTGGCCAGAAGCGGAA	
<i>xpt</i> -up	5' TTATTAGAAGAGCGCATCCT	486
<i>xpt</i> -dn	5' AGATCTGCCTCCTTAAATAC	

Затем амплифицированные фрагменты прямо сиквенировались в обоих направлениях и сиквенированная последовательность каждого из семи локусов сравнивается с последовательностями всех известных аллелей данных локусов. Систематизацию аллелей каждого локуса проводили общепринятым способом с использованием программного обеспечения, доступного на веб-сайте MLST (<http://www.mlst.net/>). Затем родственность между изолятами была представлена в виде дендрограммы, сконструированной методом сравнения средних арифметических парных групп, путем составления матрицы, содержащей информацию о парных различиях аллельных профилей.

В связи с общепринятым в мировой практике эпидемиологического надзора за пневмококковой инфекцией использованием метода серотипирования, мы применили эту методику в целях получения контрольных данных для сопоставления с данными, полученными при проведении мультилокусного сиквенстипирования. Все штаммы были серотипированы согласно общепринятой методике с использованием диагностической панели для серотипирования Pneumotest panel (Statens Seruminstitut, Копенгаген, Дания) [9].

Результаты и обсуждение

Для изучения возможности формирования госпитального полирезистентного штамма *S. pneumoniae*, имеющего происхождением единый клон, было проведено мультилокусное сиквенстипирование популяций штаммов пневмококка, выделенных в различных биотопах и обладающих различной антибактериальной резистентностью, сравнение популяции полирезистентных и в равном количестве взятых изолятов, выделенных при внебольничных пневмониях (всего 14 штаммов: 7 штаммов, устойчивых к пенициллину и эритромицину, а также 7 штаммов, чувствительных к антибактериальным химиопрепаратам), штаммов, выделенных у пациентов с хроническим обструктивным бронхитом (всего 8 штаммов: 4 штамма, устойчивых к пенициллину и эритромицину, и 4 штамма, чувствительных к антибактериальным химиопрепаратам), штаммов, выделенных у носителей (2 штамма, чувствительных к антибактериальным химиопрепаратам, и 2 штамма, нечувствительных к антибактериальным химиопрепаратам). Всего было проверено 26 штаммов.

Таким образом, при анализе изучаемой нами популяции микроорганизмов, возбудителей пневмококковых инфекций, выделенных от больных 1, 2 и 3-й групп методом мультилокусного сиквенстипирования было выявлено, что все штаммы, выделенные в трех популяциях, представляют собой родственные изоляты вида *Streptococcus pneumoniae*, большинство из которых (18 из 26) обладают уникальным генотипом, определяющим наличие одного сиквенстипа для каждого штамма.

При этом можно выделить 6 кластерных групп, которые содержат штаммы, выделенные от разных больных, обладающие различными молекулярно-эпидемиологическими характеристиками (серотип, устойчивость к антибактериальным химиопрепаратам) и являющиеся генетически близкородственными.

Исходя из результатов, представленных на рис. 1, можно 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 4

полирезистентных выделенных изолятов пневмококка у носителей, 2 являются представителями единого клонального комплекса, что позволяет говорить о том, что и у носителей в обычных условиях протекают процессы внутригеномной перестройки штаммов, что может привести к формированию госпитального изолята и что, соответственно, требует профилактических мероприятий.

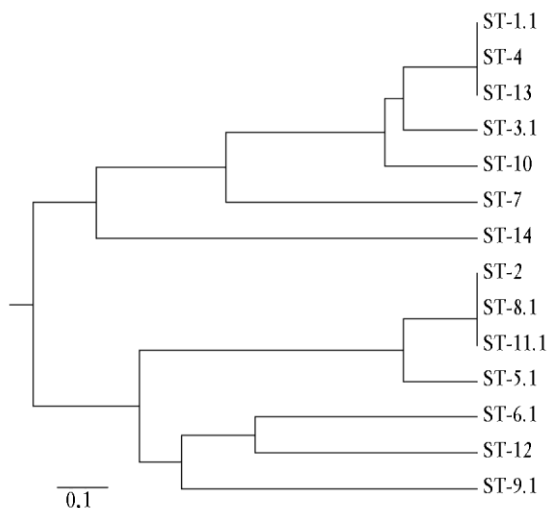


Рис. 1. Результаты мультилокусного сиквенстипирования штаммов *S. pneumoniae*, выделенных у пациентов с внебольничной пневмонией (нумерация штаммов «.1» – полирезистентные штаммы, без расширения «.1» – чувствительные к антибиотикам штаммы)

Сопоставив результаты мультилокусного сиквенстипирования всех полирезистентных штаммов (рис. 2), мы пришли к выводу о том, что наиболее высока вероятность к осуществлению событий горизонтального переноса в полирезистентных штаммах, выделяющихся у лиц пожилого возраста с хроническим обструктивным бронхитом, а также в штаммах, выделенных у пациентов с внебольничной пневмонией (табл. 2).

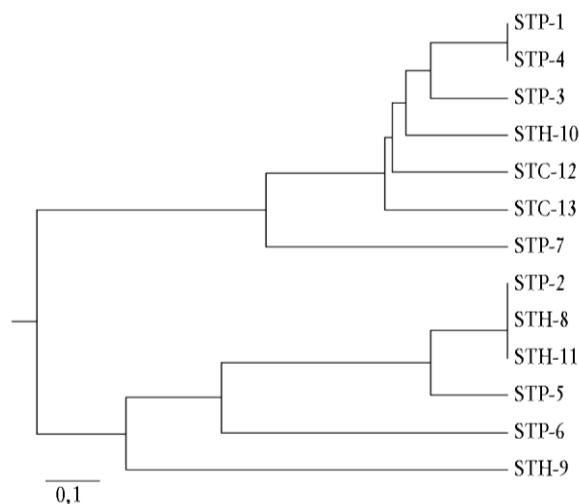


Рис. 2. Результаты мультилокусного сиквенстипирования полирезистентных штаммов пневмококка, выделенных в 1, 2 и 3-й группах. STP – штаммы, выделенные у пациентов с внебольничными пневмониями, STH – штаммы, выделенные от пациентов с обструктивным бронхитом, STC – штаммы от носителей

Таблица 2

Молекулярно-эпидемиологическая характеристика полирезистентных к антибиотикам штаммов <i>S. pneumoniae</i>										
Серотип	Результаты MLST							Резистентность		
	<i>aroE</i>	<i>gdh</i>	<i>gki</i>	<i>recP</i>	<i>spi</i>	<i>xpt</i>	<i>ddl</i>	MLST тип	пеницилин	эритромицин
<i>Штаммы, выделенные в 1-й группе (n = 14, внебольничная пневмония)</i>										
19F	7	11	10	1	6	8	14	162	ч	у
19F	1	5	4	12	5	3	8	423	ч	у
	7	11	10	1	6	8	14	158	уу	у
19F	4	4	2	4	4	1	1	81	ч	у
23F	7	5	1	1	13	31	14	440	ч	у
14	1	5	4	5	5	1	8	9	ч	уу
н/г	1	5	4	5	5	1	8	9	у	уу
14	7	5	1	8	14	11	14	124	у	уу
18C	7	2	1	1	10	1	21	113	у	уу
6A	2	7	4	10	10	1	27	176	у	уу
15B	8	13	14	4	17	4	14	95	уу	уу
15C	8	13	14	4	17	4	14	201	у	уу
9V	7	11	10	1	6	8	14	158	уу	у
<i>Штаммы, выделенные в 2-й группе (n = 8, ХОБЛ)</i>										
9V	7	11	10	1	6	8	14	162	уу	уу
3	7	15	2	10	6	1	22	180	уу	уу
19F	1	8	9	1	6	4	6	311	уу	у
6A	2	7	4	10	10	1	27	65	у	у
19F	1	8	4	1	1	4	6	36	у	уу
23F	1	8	9	1	6	4	6	311	уу	уу
18C	7	2	1	1	10	1	21	113	у	у

23F	7	13	8	1	10	6	37	272	уу	уу
<i>Штаммы от носителей (n = 4)</i>										
19F	1	8	10	4	9	1	3	341	ч	уу
19A	2	14	11	2	6	17	22	785	ч	уу
6B	8	37	9	29	2	12	53	344	уу	уу
6A	2	13	9	1	6	19	14	490	уу	уу

Примечание. уу – умеренно-устойчивые штаммы; у – устойчивые штаммы; ч – чувствительные штаммы; н/г – нетипируемые.

Таким образом, анализ генетического разнообразия штаммов *Streptococcus pneumoniae* показал, что среди изученных 26 чувствительных и нечувствительных (т.е. умеренно-устойчивых и устойчивых) к пенициллину и эритромицину штаммов было выделено 22 различных сиквенстипа и 4 клональных комплекса. При этом 2 комплекса были представлены более чем одним изолятом.

Заключение

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 (промежуточными) к пенициллину, эритромицину, тетрациклину 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). Основной характеристикой штаммов *S. pneumoniae* генотипа *Taiwan* 19F-14 является то, что независимо от географической области выделения, эти микроорганизмы являются полирезистентными прежде всего к бета-лактамам и макролидам. Данный сиквенстип распространен в основном в Южной Корее, Вьетнаме и Гонконге.

Среди штаммов, вызвавших у лиц пожилого возраста ХОБЛ, методом мультилокусного сиквенстипирования было идентифицировано 2 различных сиквенстипа, при этом каждый из них был представлен 5 и 3 изолятами.

Несмотря на небольшую выборку, штаммы, выделенные от носителей, оказались фенотипически неоднородными: 2 штамма были умеренно-устойчивы к пенициллину и 2 штамма чувствительны. При этом все 4 штамма были нечувствительными к эритромицину. Оба умеренно-устойчивых штамма принадлежали к сиквенстипу, идентичному штамму R6, кото-

рый является авирулентным штаммом и может рассматриваться как условно-патогенная микрофлора.

Таким образом, MLST в настоящее время является наиболее точным методом дифференцировки стрептококков и идентификации *S. pneumoniae* [8] и 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.

Литература

1. Бачинская Е.Н. Возбудители внебольничных пневмоний на пороге нового тысячелетия // Антибиотики и химиотерапия. 2000. № 45. С. 21–28.
2. Богданов М.Б., Черенькая Т.В. Микробиологическая оценка антибактериальных препаратов, используемых для эмпирической терапии внебольничных инфекций нижних дыхательных путей // Антибиотики и химиотерапия. 2000. № 10. С. 15–19.
3. Жильцов И.В., Семёнов В.М. Бета-лактамазная активность мокроты и ее влияние на эффективность антибактериальной терапии // Туберкулез и болезни легких. 2012. № 4. С. 18–26.
4. Новиков Ю.К. Диагностика и лечение внебольничных пневмоний // РМЖ. 2001. № 1. С. 11–16.
5. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: приказ МЗ СССР № 535 от 22 апреля 1985 г.
6. Семенов В.М., Дмитраченко Т.И., Жильцов И.В. Микробиологические аспекты резистентности к антимикробным препаратам // Туберкулез и болезни легких. 2012. № 4. С. 18–26.
7. Синопальников А.И., Стречунский Л.С. Новые рекомендации по ведению взрослых пациентов с внебольничной пневмонией // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2001. № 1. С. 18–21.
8. Enright M.C., Spratt B.G. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae* identification of clones association with serious invasive disease // Microbiology. 1998. P. 1445049–1445060.
9. *Streptococcus pneumoniae*. Textbook in Serotyping, Virulence Factors and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Measuring Pneumococcal Antibodies. Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark, 2013. 34 p.

Поступила в редакцию 24.03.2014 г.

Утверждена к печати 07.05.2014 г.

Мартынова А.В. (✉) – д-р мед. наук, кафедра эпидемиологии и военной эпидемиологии, Тихоокеанский ГМУ, кафедра биохимии, микробиологии и биотехнологии, Школа естественных наук, Дальневосточный федеральный университет (г. Владивосток).

Балабанова Л.А. – канд. биол. наук, лаборатория морской биохимии, Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова (г. Владивосток).

Чулакова О.А. – аспирант кафедры эпидемиологии и военной эпидемиологии, Тихоокеанский ГМУ (г. Владивосток).

✉ Мартынова А.В., тел. 8-914-701-6908; e-mail clinmicro@yandex.ru

MULTILOCI SEQUESTERANT STRAINS OF *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ISOLATED FROM ELDERLY PATIENTS WITH COMMUNITY ACQUIRED PNEUMONIA

Martynova A.V.^{1,2}, Balabanova L.A.³, Chulakova O.A.¹

¹ Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

² Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

³ Pacific Institute of Bioorganic Chemistry named after G.B. Yelyakov, Vladivostok, Russian Federation

ABSTRACT

Community-acquired pneumonias in aged patients is the significant epidemiology problem for the public health of almost all the countries. Even more important the problem of microbiological monitoring and epidemiology surveillance for the *S. pneumoniae* strains as one of the ubiquitous pathogens causing as the community-acquired pneumonias as well the other infections of respiratory tract, what defines their different epidemiological meaning.

Multilocus sequence typing is the perspective method of molecular epidemiological surveillance allowing to define the epidemiologically dangerous clones of the ubiquitous microorganisms as *Streptococcus pneumoniae*. The aim of our research was to conduct the multilocus sequence typing of pneumococci strains isolated in patients with community acquired pneumonias, bronchitis in aged patients.

Materials and methods. There were taken 14 strains of *S. pneumoniae*, isolated in patients with community-acquired pneumonias (seven of them were multiresistant), eight strains were isolated from patients with the chronic obstructive lung diseases and four strains from carriers. Multilocus sequence typing was conducted according to method to M.C. Enright and B.G. Spratt (1998).

Results. The strains, isolated in all populations were the related isolates of the species *S. pneumoniae*, the most of them had the unique genotype defining the sequence type for every strain. There were 6 strains of Taiwan 19F-14 genotype from 14 strains isolated in aged patients with community-acquired pneumonia. Among strains isolated from carriers there were prevailing the strain of R6 genotype.

Conclusion. Multilocus sequence typing allows to identify the new genotypes and to prognose the appearing of epidemiologically dangerous strains with new peculiarities.

KEY WORDS: multilocus sequence typing, pneumococcal pneumoniae, community-acquired pneumonia, *S. pneumoniae*.

Bulletin of Siberian Medicine, 2014, vol. 13, no. 3, pp. 40–45

References

1. Bachinskaya Ye.N. *Antibiotics and Chemotherapy*, 2000, no. 45, pp. 21–28 (in Russian).
2. Bogdanov M.B., Chornenkaya T.V. *Antibiotics and Chemotherapy*, 2000, no. 10, pp. 15–19 (in Russian).
3. Zhiltsov I.V., Semyonov V.M. *Tuberculosis and Lung Disease*, 2012, no. 4, pp. 18–26 (in Russian).
4. Novikov Yu.K. *Russian Medical Journal*, 2001, no. 1, pp. 11–16 (in Russian).
5. *About the unification of microbiological (bacteriological) research methods used in clinical-diagnostic laboratories of Medical Institutions: order of the Ministry of Healthcare of USSR*, 22.04.1985, no. 535 (in Russian).
6. Semyonov V.M., Dmitrachenko T.I., Zhiltsov I.V. *Tuberculosis and Lung Disease*, 2012, no. 4 (in Russian).
7. Sinopalnikov A.I., Strachunsky L.S. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, no. 1, pp. 18–21 (in Russian).
8. Enright M.C., Spratt B.G. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae* identification of clones association with serious invasive disease. *Microbiology*, 1998, pp. 1445049–1445060.
9. *Streptococcus pneumoniae*. Textbook in Serotyping, Virulence Factors and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Measuring Pneumococcal Antibodies. Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark, 2013. 34 p.

Martynova A.V. (✉), Pacific State Medical University; Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation.

Balabanova L.A., Pacific Institute of Bioorganic Chemistry named after G.B. Yelyakov, Vladivostok, Russian Federation.

Chulakova O.A., Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation.

✉ **Martynova A.V.**, Ph. +7-914-701-6908; e-mail: clinmicro@yandex.ru