

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Миронов К.О., Корчагин В.И., Михайлова Ю.В., Янушевич Ю.Г., Шеленков А.А., Чагарян А.Н., Иванчик Н.В., Козлов Р.С., Акимкин В.Г., 2020



Характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных инвазивными пневмококковыми инфекциями, с использованием высокопроизводительного секвенирования

Миронов К.О.^{1✉}, Корчагин В.И.¹, Михайлова Ю.В.¹, Янушевич Ю.Г.¹, Шеленков А.А.¹, Чагарян А.Н.², Иванчик Н.В.², Козлов Р.С.², Акимкин В.Г.¹

¹ФБУН «Центральный НИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, Москва, Россия;

²НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России, 214019, Смоленск, Россия

Цель работы — характеристика антигенных и генетических свойств штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных инвазивными формами пневмококковой инфекции, на основании данных высокопроизводительного секвенирования.

Материалы и методы. Исследовано 46 штаммов *S. pneumoniae*, выделенных при проведении многоцентровых исследований «ПеГАС» в течение 2015–2018 гг. Секвенирование проводилось с использованием реагентов и оборудования фирмы «Illumina». При обработке данных использовались программы «SPAdes» (Россия), «SeroBA» и «PneumoCaT», а также программные возможности PubMLST.org.

Результаты и обсуждение. Определены полногеномные последовательности штаммов, информация внесена в базу данных PubMLST (id: 51080–51125). У 10 (21%) штаммов найден серотип 3. По 5 (11%) штаммов принадлежали к серотипу 19F и серогруппе 6, из которых у 2 определен серотип 6A, по 1 — 6B и 6BE, у 1 был дискордантный результат (6A или 6BE). У 3 (6,5%) штаммов найден серотип 15B. Двукратно обнаружены серотипы 7F, 8, 9V, 14, 22F, 23F и 28A, однократно — 1, 4, 9N, 10C, 12F, 18C, 35F, 37 и 38. Доля штаммов с серотипами, входящими в состав PCV13, составляет 65%, в состав PPV23 — 80%. У штаммов установлено 36 сиквенс-типов, из которых 6 — впервые. Мультилокусное секвенирование-типирование не позволяет выявить преобладающий сиквенс-тип или определить клональные комплексы, за исключением штаммов серотипа 3. Невозможность обозначить клональные комплексы согласуется с полученными ранее данными об отсутствии выраженной клональной структуры *S. pneumoniae*, ассоциированных с пневмококковыми менингитами на территории России.

Заключение. С учетом эпидемиологических данных об источниках штаммов и информации о прививочном статусе полученные результаты позволяют оценить эффективность существующих пневмококковых вакцин в отношении инвазивных форм пневмококковых инфекций и предоставляют информацию для расширения возможностей основанных на ПЦР способов серотипирования.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*; инвазивные пневмококковые инфекции; высокопроизводительное секвенирование; серотипирование; мультилокусное секвенирование-типирование.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Миронов К.О., Корчагин В.И., Михайлова Ю.В., Янушевич Ю.Г., Шеленков А.А., Чагарян А.Н., Иванчик Н.В., Козлов Р.С., Акимкин В.Г. Характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных инвазивными пневмококковыми инфекциями, с использованием высокопроизводительного секвенирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(2): 113–118.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-113-118>

Поступила 20.02.2020
Принята в печать 27.02.2020

Characterization of *Streptococcus Pneumoniae* Strains Causing Invasive Infections Using Whole-Genome Sequencing

Konstantin O. Mironov¹✉, Vitaly I. Korchagin¹, Yuliya V. Mikhailova¹, Yurii G. Yanushevich¹, Andrey A. Shelenkov¹, Aida N. Chagaryan², Natali V. Ivanchik², Roman S. Kozlov², Vasily G. Akimkin¹

¹Central Research Institute of Epidemiology, 111123, Moscow, Russia;

²Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical University, 214019, Smolensk, Russia

Purpose: antigenic and genetic characterization of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from patients with invasive forms of pneumococcal infection using whole-genome sequencing.

Materials and Methods. The study was performed on 46 *S. pneumoniae* strains isolated during the PEHASus multicenter studies in 2015–2018. Sequencing was performed using Illumina protocols and equipment. The SPAdes, SeroBA, PneumoCaT software were used for data processing, as well as BIGSdb software (PubMLST.org).

Results and Discussion. Whole-genome sequences of strains were obtained; the information was entered into the PubMLST database (id: 51080–51125). Ten (21%) strains were found to have serotype 3. Five (11%) strains belonged to serotype 19F and five to serogroup 6; two of them belonged to serotype 6A; one strain had 6B and 1 had 6BE serotype; 1 strain showed discordant result (6A or 6BE). Serotype 15B was identified in 3 (6.5%) strains. Serotypes 7F, 8, 9V, 14, 22F, 23F and 28A were identified in two strains each; serotypes 1, 4, 9N, 10C, 12F, 18C, 35F, 37 and 38 were found once. The proportion of strains with serotypes included in PCV13 and PPV23 vaccines was 65% and 80%, respectively. 36 sequence types were found in strains; out of them, 6 sequence types were found for the first time. A dominant sequence type or clone complexes could not be identified using multilocus sequence typing except for serotype 3 strains. The inability to identify clonal complexes is in congruence with the previously obtained data on the absence of *S. pneumoniae* clones associated with pneumococcal meningitis in Russia.

Conclusion. The information about serotypes of *S. pneumoniae* causing invasive infections together with epidemiologic data about strain sources and vaccination allows us to evaluate the effectiveness of pneumococcal vaccines and provide information for improving the PCR-based routine serotyping.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*; invasive pneumococcal infection; high-throughput sequencing; serotyping; multilocus sequence typing; whole genome sequencing.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Mironov K.O., Korchagin V.I., Mikhailova Y.V., Yanushevich Y.G., Shelenkov A.A., Chagaryan A.N., Ivanchik N.V., Kozlov R.S., Akimkin V.G. Characterization of *Streptococcus pneumoniae* strains causing invasive infections using whole-genome sequencing. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(2): 113–118. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-113-118>

Received 20 February 2020

Accepted 27 February 2020

Введение

Бактерии вида *Streptococcus pneumoniae* являются возбудителями пневмококковых инфекций (ПИ), которые подразделяют на неинвазивные и инвазивные [1]. Наиболее часто диагностируемые инвазивные формы ПИ — гнойный бактериальный менингит, бактериемическая пневмония и сепсис. Распространенными способами внутривидовой характеристики *S. pneumoniae* являются антигенная характеристика полисахарида капсулы — определение серогрупп или серотипов, которых описано более 90, и генетическая характеристика с помощью мультилокусного секвенирования-типирования (МЛСТ) [2, 3]. Диагностика инвазивных ПИ и характеристика вызвавших их возбудителей является не только актуальной клинической задачей, направленной на выбор тактики лечения, но и важным элементом эпидемиологического надзора, позволяю-

щим охарактеризовать вклад тех или иных возбудителей в структуру общей заболеваемости ПИ и осуществлять планирование профилактических мероприятий, основным из которых является вакцинация [1]. В настоящее время в России широкое применение получили 13-валентная конъюгированная пневмококковая вакцина (PCV13, «Превенар 13») и 23-валентная полисахаридная вакцина (PPV23, «Пневмовакс 23»).

Определение серотипов *S. pneumoniae* может быть проведено с применением серологических методов — реакции набухания капсулы или латекс-агглютинации, например с помощью факторных антисывороток или набора реагентов «Pneumotest-Latex» (Statens Serum Institut, Дания). Поскольку нуклеотидные последовательности генов (*cps*-локус), кодирующих синтез и сборку капсульного полисахарида, известны [4], существует возможность

определения серогрупп и серотипов методом ПЦР с праймерами для амплификации серотип-специфических мишеней в геноме *S. pneumoniae*. В частности, широко распространены подходы, рекомендованные Центрами по контролю и профилактике заболеваний США [5] для определения 40 серотип-специфических мишеней, в основе которых — работа R. Pai и соавт. [6]. В ЦНИИ Эпидемиологии разработана и применяется 4-плексная методика для определения 16 серотипов с помощью ПЦР в режиме реального времени (методика включает все серотипы, входящие в PCV13) [7]. Полученные проспективные данные о серогрупповом составе возбудителей также могут определять тактику лабораторных исследований, направленных на установку антигенных особенностей возбудителей отдельных форм ПИ, циркулирующих в текущий момент времени.

Микробиологический мониторинг штаммов, вызывающих различные формы ПИ, с помощью метода МЛСТ является важной практической задачей, направленной на определение генетических особенностей циркулирующих штаммов и своевременное выявление резистентных возбудителей или штаммов с повышенными вирулентными свойствами, возникающих в результате рекомбинационных процессов или импортируемых, с целью мониторинга их распространения [2]. Основным преимуществом МЛСТ перед другими молекулярно-биологическими методами типирования является возможность объединения данных через интернет-ресурс PubMLST.org [3].

Использование серологических и основанных на ПЦР методов не всегда позволяет охарактеризовать все многообразие существующих возбудителей ПИ, вынужденных постоянно адаптироваться под давлением популяционного иммунитета. В то же время полногеномный анализ дает возможность получать исчерпывающие данные об антигенных и генетических свойствах возбудителей, которые в том числе могут быть использованы при разработке и совершенствовании существующих основанных на ПЦР подходов для определения серотипов. В связи с этим **цель** данной работы заключалась в характеристике антигенных и генетических свойств штаммов *S. pneumoniae*, ассоциированных с инвазивными формами ПИ, на основании данных высокопроизводительного секвенирования.

Материалы и методы

Использовано 46 штаммов *S. pneumoniae*, выделенных из крови ($n = 10$) и спинномозговой жидкости ($n = 36$) больных инвазивными формами ПИ при проведении многоцентровых исследований «ПеГАС» [8] в 2015–2018 гг. Транспортировка штаммов в центральную лабораторию (НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России) осуществлялась на среде Дорсе.

В центральной лаборатории проводилась видовая идентификация штаммов. Штаммы высевались на кровяной агар «BioMedia» (Россия), их идентификация микробиологическими методами (учет морфологии колоний, наличие α -гемолиза, результат отрицательной каталазной реакции, определение чувствительности к оптохину) подтверждалась в реакции латекс-агглютинации с использованием набора «Slidex Pneumo-Kit» («bioMerieux»). Для видовой идентификации штаммов также применялся метод времяпролетной масс-спектрометрии с использованием реагентов и оборудования фирмы «Bruker Daltonics». Все штаммы хранили в пробирках с триптиказо-соевым бульоном («bioMerieux») с добавлением 30% стерильного глицерина («Sigma») при -70°C .

ДНК выделяли с использованием набора «DNeasy Blood & Tissue Kits» («Qiagen»). Секвенирование проводили в отделе молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии». Концентрацию полученных образцов ДНК измеряли на приборе «Qubit 4.0» с помощью «Qubit dsDNA HS Assay Kit» («Thermo Fisher Scientific»), для пробоподготовки использовали 40 нг геномной ДНК. Пробоподготовку проводили по протоколу «Nextera» («Illumina»). Индексированные полногеномные библиотеки пулировались в эквимольном соотношении, пулы очищались и отбирались по длине с помощью «SpeedBeads Magnetic Carboxylate Modified Particles» («GE Healthcare»). Качество пулов проверяли с помощью «High Sensitivity DNA Kit» («Agilent»). Высокопроизводительное секвенирование осуществляли на приборе «HiSeq 1500» с использованием наборов «HiSeq PE Rapid Cluster Kit v2» и «HiSeq Rapid SBS Kit v2» («Illumina»).

Сборку полногеномных нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы «SPAdes» версии 3.13 (Россия) [9]. Для определения серотипов *S. pneumoniae* использовали программы «SeroBA» [10] и «PneumoCaT» [11]. Обозначение аллелей и сиквенс-типов проведено в соответствии со схемой МЛСТ для бактерий вида *S. pneumoniae* [2]. При обработке результатов секвенирования и МЛСТ использовались биоинформационные возможности интернет-ресурса PubMLST.org [3]. На момент окончания исследования база данных PubMLST [12] содержала результаты типирования около 48 тыс. изолятов, включая более 14 тыс. полногеномных последовательностей *S. pneumoniae*, из которых 19 были получены при секвенировании российских изолятов, ассоциированных преимущественно с неинвазивными формами ПИ.

Результаты

Определены полногеномные нуклеотидные последовательности всех штаммов, включенных в исследование. Подробная информация о штаммах,

содержащая фенотипические характеристики: серотип, чувствительность к антибиотикам (для 38 штаммов) и данные об источнике (год, территория, возраст, форма ПИ), внесена в базу данных PubMLST [12]; штаммам присвоены номера (id): 51080–51125. База данных PubMLST также содержит информацию об оценке качества сборки полногеномных последовательностей (N50, L50, N90 и другие параметры) секвенированных штаммов.

В результате анализа полногеномных данных с использованием двух алгоритмов [10, 11] удалось определить серотиповую принадлежность всех изученных штаммов. У 10 (21%) штаммов установлен серотип 3. По 5 (11%) штаммов принадлежали серотипу 19F и серогруппе 6, из которых у 2 штаммов определен серотип 6A, по одному — 6B и 6BE и у одного (id-51089) — дискордантный результат: 6A или 6BE. У 3 (6,5%) штаммов выявлен серотип 15B. Двукратно найдены серотипы 7F, 8, 9V, 14, 22F, 23F и 28A, однократно — 1, 4, 9N, 10C, 12F, 18C, 35F, 37 и 38.

Для всех штаммов проведено обозначение 7 аллелей и определены сиквенс-типы [2]. Найдено 6 не описанных ранее сиквенс-типов: ST-15247–15250 (образованы не встречавшимися ранее комбинациями аллелей), ST-15251 и ST-15252 (содержат в аллельном профиле впервые найденные аллели agoE-510 и хрт-924 соответственно).

Обсуждение

Используемые до настоящего времени в отечественной практике способы определения серотипов *S. pneumoniae*, ассоциированных с инвазивными ПИ, основанные на применении серологических реакций, ПЦР или сочетаний обоих подходов, не позволяли проводить характеристику всех анализируемых штаммов или клинических образцов, содержащих ДНК инкапсулированных (ср-положительных) изолятов, в полном объеме. Это связано как с ограниченным набором используемых в методиках антител или серотип-специфических мишеней, так и с возможными ложноотрицательными результатами, что не позволяет охарактеризовать все антигенное многообразие возбудителей, способных вызывать ПИ. Например, с использованием основанной на ПЦР методики [7] при характеристике 89 образцов спинномозговой жидкости от больных пневмококковым менингитом, выделенных в 2007–2010 гг. в Москве, удалось определить серотип в 79% случаев; в этом же исследовании применение дополнительных серотип-специфических мишеней с альтернативными праймерами [5, 6] не позволило качественно увеличить долю определяемых серотипов. При использовании той же методики для изучения 235 штаммов и биологических образцов, полученных от больных пневмококковым менингитом в 2010–2014 гг. на территории России, удалось оха-

актеризовать почти такую же долю возбудителей — 76% [13]. Это примерно на 10% больше, чем доля штаммов, серотип которых удалось бы определить в данном исследовании: использование методики [7] позволило бы выявить серотип у 31 (67%) штамма.

Распределение и относительное соотношение серотипового состава циркулирующих возбудителей могут варьировать в зависимости от эпидемиологических особенностей, которые в том числе включают применение тех или иных поливалентных вакцин. Для штаммов, охарактеризованных в данном исследовании, доля случаев, обусловленных серотипами, входящими в состав PCV13, составляет 65%, в состав PPV23 — 80%. Уменьшение в 2015–2018 гг. доли случаев инвазивных ПИ, вызванных серотипами *S. pneumoniae* из состава PCV13, может быть связано с увеличением охвата вакцинацией и, возможно, с введением пневмококковой вакцины в календарь профилактических прививок в 2014 г. В то же время, несмотря на то что вакцины PCV13 и PPV23 содержат серотипы 3, 6 и 19F, среди охарактеризованных штаммов эти серотипы встречаются чаще других, как и в предыдущие годы [1, 13]. На особенность исследованной выборки также указывает относительно высокая доля штаммов с серотипом 15B и присутствие штаммов с серотипами 28A, 37 и 38, которые ранее не были ассоциированы с пневмококковыми менингитами на территории России.

С учетом эпидемиологических данных об источниках штаммов и информации о прививочном статусе полученные результаты позволяют оценить эффективность существующих пневмококковых вакцин в отношении инвазивных форм ПИ, а также диктуют необходимость расширения возможностей основанных на ПЦР способов определения серотипов [7] за счет использования дополнительных серотип-специфических мишеней, ориентированных главным образом на детекцию *S. pneumoniae* серотипов 15B, 8, 22F и 12F.

В охарактеризованной выборке штаммов найдено 36 сиквенс-типов. Основанный на МЛСТ анализ не позволяет выявить преобладающий сиквенс-тип или определить клональные комплексы, за исключением штаммов серотипа 3, для которых характерно образование клонального комплекса, объединяющего сиквенс-типы ST-180 (5 штаммов), ST-505 (2 штамма) и ST-2049, ST-15250, ST-15251 (по 1 штамму). Сопоставление найденных сиквенс-типов с сиквенс-типами 108 изолятов, выделенных от больных пневмококковым менингитом на территории России в других исследованиях, данные о которых были опубликованы в PubMLST [12], демонстрирует присутствие в обеих выборках у штаммов с серотипом 3 сиквенс-типов ST-180 и ST-505, у штаммов других серотипов — сиквенс-типов ST-236, ST-239 и ST-1262, остальные сиквенс-типы не совпадали с найденными ранее. Невозможность

обозначить клональные комплексы в охарактеризованной выборке штаммов, относительно высокая частота впервые обнаруженных сиквенс-типов (6 из 36) и несовпадение подавляющего большинства выявленных сиквенс-типов с найденными на наблюдаемой территории в предыдущие годы, согласуются с полученными ранее данными об отсутствии выраженной клональной структуры *S. pneumoniae*, ассоциированных с пневмококковыми менингитами на территории России [1].

В целом результаты полногеномного секвенирования позволяют получать исчерпывающую информацию об антигенных и генетических свойствах *S. pneumoniae*, циркулирующих в данный момент времени. Дальнейшее использование полногеномных данных должно быть направлено на анализ эволюционных процессов и генетических взаимоотношений охарактеризованных штаммов со штаммами, выделяемыми при других ПИ на основании МЛСТ, проведенного по «основному» геному (core genome), а также на анализ генетических факторов, определяющих устойчивость к антибиотикам и механизмы развития резистентности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Покровский В.И., Творогова М.Г., Шипулин Г.А., ред. *Молекулярная диагностика инфекционных болезней*. М.: РИПОЛ классик; 2018.
2. Enright M.C., Spratt B.G. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology*. 1998; 144 (Pt. 11): 3049-60.
DOI: <http://doi.org/10.1099/00221287-144-11-3049>
3. Jolley K.A., Bray J.E., Maiden M.C.J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res*. 2018; 3: 124.
DOI: <http://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
4. Bentley S.D., Aanensen D.M., Mavroidi A., Saunders D., Rabinowitsch E., Collins M., et al. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet*. 2006; 2(3): e31.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020031>
5. Conventional PCR deduction of 40 pneumococcal serotypes or serogroups. Available at: <http://www.cdc.gov/streplab/pcr.html> (Accessed 17.02.2020)
6. Pai R., Gertz R.E., Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(1): 124-31.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JCM.44.1.124-131.2006>
7. 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): 41-8.
8. Иванчик Н.В., Чагарян А.Н., Сухорукова М.В., Козлов Р.С., Дехнич А.В., Кречикова О.И. и др. Антибиотикорезистентность клинических штаммов *Streptococcus pneumoniae* в России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «ПеГАС 2014–2017». *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019; 21(3): 230-37.
DOI: <http://doi.org/10.36488/cmasc.2019.3.230-237>
9. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm

and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5): 455-77.

DOI: <http://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>

10. 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: <http://doi.org/10.1099/mgen.0.000186>
11. 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: <http://doi.org/10.7717/peerj.2477>
12. Streptococcus pneumoniae MLST Databases. Available at: <https://pubmlst.org/spneumoniae/> (Accessed 17.02.2020)
13. Белошицкий Г.В., Королева И.С., Королева М.А. Серотиповой пейзаж пневмококков, выделенных при пневмококковом менингите в Российской Федерации. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015; 14(2): 19-25.

REFERENCES

1. Pokrovskiy V.I., Tvorogova M.G., Shipulin G.A., eds. *Molecular Diagnostics of Infectious Diseases [Molekulyarnaya diagnostika infektsionnykh bolezney]*. Moscow: RIPOL klassic; 2018. (in Russian)
2. Enright M.C., Spratt B.G. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology*. 1998; 144(Pt. 11): 3049-60.
DOI: <http://doi.org/10.1099/00221287-144-11-3049>
3. Jolley K.A., Bray J.E., Maiden M.C.J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res*. 2018; 3: 124.
DOI: <http://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
4. Bentley S.D., Aanensen D.M., Mavroidi A., Saunders D., Rabinowitsch E., Collins M., et al. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet*. 2006; 2(3): e31.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020031>
5. Conventional PCR deduction of 40 pneumococcal serotypes or serogroups. Available at: <http://www.cdc.gov/streplab/pcr.html> (Accessed 17.02.2020)
6. Pai R., Gertz R.E., Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(1): 124-31.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JCM.44.1.124-131.2006>
7. 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): 41-8. (in Russian)
8. Ivanchik N.V., Chagaryan A.N., Sukhorukova M.V., Kozlov R.S., Dekhnic A.V., Krechikova O.I., et al. Antimicrobial resistance of clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Russia: the results of multicenter epidemiological study «PEHASus 2014–2017». *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2019; 21(3): 230-37.
DOI: <http://doi.org/10.36488/cmasc.2019.3.230-237> (in Russian)
9. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5): 455-77.
DOI: <http://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
10. 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: <http://doi.org/10.1099/mgen.0.000186>

11. 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: <http://doi.org/10.7717/peerj.2477>

12. Streptococcus pneumoniae MLST Databases. Available at: <https://pubmlst.org/spneumoniae/> (Accessed 17.02.2020)
13. Beloshitskiy G.V., Koroleva I.S., Koroleva M.A. Landscape of serotypes pneumococcus isolate with pneumococcal meningitis in the Russian Federation. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika.* 2015; 14(2): 19-25. (in Russian)

Информация об авторах:

Миронов Константин Олегович [✉] — д.м.н., рук. научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии», 111123, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8207-9215>.

E-mail: mironov@pcr.ru

Корчагин Виталий Иванович — к.б.н., н.с. научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии», 111123, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2264-6294>

Михайлова Юлия Владимировна — к.б.н., руководитель научной группы новых технологий молекулярного анализа ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии», 111123, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5646-538X>

Янушевич Юрий Григорьевич — н.с. научной группы новых технологий молекулярного анализа ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии», 111123, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9061-752X>

Шеленков Андрей Александрович — к.ф.-м.н., н.с. научной группы новых технологий молекулярного анализа ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии», 111123, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7409-077X>

Чажарян Аида Нуримановна — к.б.н., н.с. лаборатории молекулярной диагностики НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ, 214019, Смоленск, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9195-8764>

Иванчик Натали Владимировна — к.м.н., н.с. лаборатории антибиотикорезистентности НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ, 214019, Смоленск, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9392-0732>

Козлов Роман Сергеевич — д.м.н., проф., директор НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ, 214019, Смоленск, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8728-1113>

Акимкин Василий Геннадьевич — д.м.н., проф., акад. РАН, директор ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии», 111123, Москва, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8139-0247>

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors:

Konstantin O. Mironov [✉] — Doct. Sci. (Med.), Head, Scientific group of developing new genetic polymorphisms detection methods, Central Research Institute for Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8207-9215>.

E-mail: mironov@pcr.ru

Vitaly I. Korchagin — PhD (Biol.), researcher, Scientific group of developing new genetic polymorphisms detection methods, Central Research Institute for Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2264-6294>

Yuliya V. Mikhailova — PhD (Biol.), Head, Scientific group of novel techniques for molecular analysis, Central Research Institute for Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5646-538X>

Yurii G. Yanushevich — researcher, Scientific group of novel techniques for molecular analysis, Central Research Institute for Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9061-752X>

Andrey A. Shelonkov — PhD (Phys.-Math.), researcher, Scientific group of novel techniques for molecular analysis, Central Research Institute for Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7409-077X>

Aida N. Chagaryan — PhD (Biol.), researcher, Molecular diagnostics laboratory, Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical University, 214019, Smolensk, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9195-8764>

Natali V. Ivanchik — PhD (Med.), researcher, Antibiotic resistance laboratory, Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical University, 214019, Smolensk, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9392-0732>

Roman S. Kozlov — Doct. Sci. (Med.), Prof., Director, Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical University, 214019, Smolensk, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8728-1113>

Vasily G. Akimkin — Doct. Sci. (Med.), Prof., Academician of the Russian Academy of Sciences, Director, Central Research Institute for Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8139-0247>

Contribution: the authors contributed equally to this article.