

SEROTYPE DISTRIBUTION AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ISOLATED FROM PATIENTS WITH PNEUMOCOCCAL PNEUMONIA

DISTRIBUCIJA SEROTIPOVA I OSETLJIVOST NA ANTIBIOTIKE SOJEVA *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* IZOLOVANIH OD PACIJENATA SA PNEUMOKOKNOM PNEUMONIJOM

Farah Hamzagić¹, Jovana Ranin¹, Ina Gajić^{1,2}, Nataša Opavski^{1,2}, Lazar Ranin^{1,2}

¹ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

² Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Beograd, Srbija

Correspondence: hamzagicf98@gmail.com

Abstract

Introduction: *Streptococcus pneumoniae* is a major cause of community-acquired pneumonia (CAP). In Serbia, pneumococcal conjugate vaccines PCV-10 and PCV-13 were licensed for immunization in 2018.

Aim: The aim of this study was to evaluate serotype distribution and antimicrobial susceptibility of *S. pneumoniae* isolated from patients with pneumococcal pneumonia.

Material and methods: Isolates of *S. pneumoniae* were recovered from patients with CAP admitted to 18 hospitals throughout Serbia from 2012-2020. Confirmation of the identification was performed using *lytA* gene detection by PCR. Serotyping and antimicrobial susceptibility testing was performed by Quellung reaction and disk diffusion/gradient test, respectively. Interpretation of the susceptibility testing was done according to the current European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing recommendations.

Results: During the study period, a total of 100 isolates of *S. pneumoniae* were collected. Overall, 19 pneumococcal serotypes were identified. The predominant types observed, in order of decreasing frequency, were 3 (37%), 14 (16%), 6B (6%), 7F (5%), 9V (4%), and 4 (4%); further, 2% of the isolates were non-typeable. However, the most common serotype among children < 2 years old was 14 (27.3%). The vaccine coverage of strains isolated from children < 5 years was higher with PCV-13 compared to PCV-10 (86,7% vs. 46,7%, $p = 0.008$). Additionally, the vaccine coverage of pneumococci isolated from patients >2 years was higher with the PPV-23 than with PCV-13 (96.6% vs. 84.3%, $p = 0.0230$). Ten isolates (10%) were PPV-23/nonPCV-13, whereas four isolates (4%) were non-typable (17A, 23A, and 9A). Serotype 3 significantly increased from pre-vaccine to post-vaccine period (30.8% vs. 60.8%, $p = 0.0108$). The overall antimicrobial resistance rates were as follows: penicillin - 9%, ceftriaxone - 2%, erythromycin - 24%, clindamycin - 16%, tetracycline - 11%, and trimethoprim-sulfamethoxazole - 21%.

Conclusion: More than 70% of the isolated strains belonged to the serotypes 3, 14, 6B, 9B, and 4. The highest resistance rates of the tested pneumococci were found for macrolides and trimethoprim-sulfamethoxazole.

Keywords:

Streptococcus pneumoniae, serotypes, antimicrobial resistance, pneumonia

Sažetak

Uvod: *Streptococcus pneumoniae* je najčešći uzročnik vanbolničkih pneumonija. Konjugovane vakcine, PCV-10 i PCV-13, deo su obaveznog programa imunizacije Republike Srbije od 2018. godine.

Cilj: Cilj istraživanja je bio da se odredi distribucija serotipova i osetljivost na antibiotike sojeva *S. pneumoniae*, izolovanih od pacijenata sa pneumokoknim pneumonijama.

Materijal i metode: Ispitivanje je obuhvatilo sojeve *S. pneumoniae* izolovane iz kliničkih uzoraka pacijenata koji su bili hospitalizovani u 18 bolnica širom Srbije u periodu od 2012. do 2020. godine. Potvrda identifikacije izvršena je detekcijom *lytA* gena metodom lančane reakcije polimerizacije (PCR). Serotipizacija je izvršena reakcijom bubrenja kapsule. Osetljivost na antibiotike procenjena je disk difuzionim testom i difuzijom u gradijentu koncentracije, primenom najnovijih preporuka Evropskog komiteta za testiranje osetljivosti na antibiotike.

Rezultati: U posmatranom periodu je sakupljeno 100 izolata *S. pneumoniae*, kod kojih je identifikovano 19 serotipova. Najzastupljeniji tipovi su bili 3 (37%), 14 (16%), 6B (6%), 7F (5%), 9V (4%) i 4 (4%). Tipizacija nije bila moguća kod 2% izolata. U populaciji dece < 2 godine najčešći serotip je bio 14 (27,3%). Kod dece < 5 godina ukupna zastupljenost serotipova koji su obuhvaćeni vakcinom PCV-13 (86,7%) bila je značajno viša nego učestalost serotipova koji su zastupljeni u PCV-10 (46,7%) ($p = 0,008$). U populaciji > 2 godine zastupljenost pneumokoknih tipova koji su obuhvaćeni vakcinom PPV-23 (96,6%) bila je statistički značajno viša od učestalosti serotipova koji se nalaze u PCV-13 (84,3%) ($p = 0,023$). Deset izolata (10%) je pripadalo kategoriji PPV-23/non-PCV-13, dok su četiri soja (4%) bila nevakcinalna. Učestalost serotipa 3 je bila značajno viša u postvakcinalnom u odnosu na prevakcinalni period (60,8% vs. 30,8%, $p = 0,0108$). Procenjene učestalosti rezistencije na antibiotike su sledeće: penicilin - 9%, ceftriakson - 2%, eritromicin - 24%, klindamicin - 16%, tetraciklin - 11% i trimetoprim-sulfametoksazol - 21%.

Zaključak: Više od 70% izolovanih sojeva pripadalo je serotipovima 3, 14, 6B, 9V i 4. Testirani izolati su imali najvišu učestalost rezistencije na makrolide i trimetoprim-sulfametoksazol.

Ključne reči:

Streptococcus pneumoniae, serotipovi, rezistencija na antibiotike, pneumonije

Uvod

Streptococcus pneumoniae (pneumokok) oportunistički je patogen koji može asimptomatski da kolonizuje nazofarinks, ali i da bude uzročnik različitih infekcija (1). *S. pneumoniae* može izazvati invazivne bolesti kao što su meningitis i sepsa, ali i širok dijapazon neinvazivnih bolesti poput upale srednjeg uha i sinusitisa (2). Pneumokok je najčešći bakterijski uzročnik vanbolničke pneumonije. Kod pacijenata sa upalom pluća pneumokok obično ne prodire u krv, te se takva infekcija smatra neinvazivnom bolešću. Ipak, kod oko 20% pacijenata sa pneumokoknom pneumonijom ovaj patogen se može izolovati i iz krvi, što ukazuje na invazivnu pneumokoknu bolest (IPB) (3).

Povećan rizik za razvoj pneumokoknih infekcija imaju deca, posebno mlađa od 5 godina, stariji od 65 godina, imunosuprimirani, posebno splenektomisani i pacijenti sa hroničnim bolestima.

Najvažniji faktor virulencije pneumokoka je polisaharidna kapsula. Na osnovu njene antigenske građe, razlikuje se najmanje 97 serotipova pneumokoka (4). Kako je imunski odgovor tipski specifičan, vakcine koje se koriste u prevenciji pneumokoknih bolesti sadrže kapsularne antigene najznačajnijih pneumokoknih tipova. Pneumokokne konjugovane vakcine (engl. *pneumococcal conjugate vaccine*, PCV) i pneumokokna polisaharidna vakcina (engl. *pneumococcal polysaccharide vaccine*, PPV) deo su vakcinalnih programa mnogih zemalja. Pneumokokna konjugovana vakcina je prvi put licencirana 2000. godine i do

danas je uključena u nacionalne imunizacione programe u više od 145 zemalja. Nakon inicijalnog uvođenja 7-valentne PCV, u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), ali i brojnim drugim zemljama, uočena je redukcija vanbolničkih pneumonija za više od 40% (5). Uočen je i značajan pad incidencije invazivnih serotipova koji su pokriveni vakcinama (engl. *vaccine serotype coverage*), tj. tipova čiji su kapsularni antigeni sastavni deo vakcina. Primetno je i smanjenje vakcinalnih serotipova kod neinvazivnih bolesti i nazofaringealnog kliconoštva. Međutim, iako se seroepidemiologija invazivnih pneumokoknih bolesti u velikom broju zemalja opsežno prati, manji broj istraživanja je usmeren na ispitivanje efekta pneumokoknih vakcina na neinvazivne bolesti. U Srbiji su 10-valentna i 13-valentna PCV deo programa obavezne imunizacije dece starije od 2. meseca od 2018. godine. Desetivalentna PCV sadrži serotipove 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F i 23F, dok PCV-13 obuhvata navedenih 10 serotipova i tri dodatna, 3, 6A i 19A.

U lečenju pneumokoknih pneumonija beta laktamski antibiotici predstavljaju prvu terapijsku liniju. Međutim, u brojnim zemljama širom sveta beleži se porast učestalosti sojeva koji su rezistentni na penicilin (engl. *penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae*, PRSP) (6,7). Uočen je i trend porasta rezistencije pneumokoka na druge antimikrobne agense, kao što su makrolidi, tetraciklini, trimetoprim-sulfametoksazol i fluorohinoloni (6). Ipak, ohrabruje činjenica da primena pneumokoknih vakcina dovodi do smanjenja učestalosti rezistencije na antibiotike (8).

Praćenje distribucije serotipova i prevalencije rezistencije na antibiotike preduslovi su prevencije pneumokoknih bolesti i optimizacije terapijskih protokola. Ciljevi ovog istraživanja su, stoga, određivanje distribucije serotipova i profila rezistencije sojeva *S. pneumoniae* izolovanih od pacijenata sa pneumokoknom pneumonijom.

Materijal i metode

Dizajn studije i bakterijski izolati

Ova studija predstavlja retrospektivnu analizu dela kolekcije sojeva *S. pneumoniae* koja se generiše u okviru rutinskog rada Nacionalne referentne laboratorije (NRL) za streptokok. Analizom su obuhvaćeni svi sojevi *S. pneumoniae* koji su izolovani: 1) iz donjeg respiratornog trakta i 2) iz krvi i donjeg respiratornog trakta pacijenata sa kliničkim i laboratorijskim znacima bakterijske pneumonije. Analizom su obuhvaćene sve osobe (deca: < 18 godina; odrasli: 18 ≥ godina) koje su bile hospitalizovane u 18 sekundarnih i tercijarnih zdravstvenih ustanova širom Srbije u periodu od 1. januara 2012. do 31. decembra 2020. godine. Izolati su identifikovani u regionalnim mikrobiološkim laboratorijama na osnovu morfoloških karakteristika (gram pozitivni diplokok), kulturelnih (α -hemoliza), fiziološko-biohemijskih osobina (osetljivost na optohin) i reakcije aglutinacije sa polivalentnim antiserumom specifičnim za *S. pneumoniae* (*Slidex PneumoKit*, *bioMerieux*, Francuska). Izolovani i identifikovani sojevi pneumokoka su u transportnom medijumu (*Amies gel Transystem*, *Copan*, Italija) slati u NRL za streptokok radi daljih analiza.

Potvrda identifikacije je obavljena testom lize u prisustvu žučnih soli (Na-deoksiholat, *Sigma-Aldrich*, Nemačka) i detekcijom gena koji kodira pneumokokni autolizin (*lytA*), metodom lančane reakcije polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) (9). Serotipizacija je izvršena reakcijom bubrenja kapsule (*Quellung* reakcijom) sa serogrupnim i serotipskim antiserumima na kapsularne polisaharide, prema uputstvu proizvođača (*Statens Serum Institute*, Kopenhagen, Danska). Izolati su konzervirani u podlozi sa obranom mlekom na - 80 °C.

Osetljivost pneumokoka na penicilin, ceftriakson, eritromicin, klindamicin, tetraciklin, hloramfenikol i trimetoprim-sulfametoksazol određena je disk difuzionom metodom (diskovi impregnirani antibiotikom, *BioRad*, SAD) i testom difuzije u gradijentu koncentracije (E-test, *bioMerieux*, Francuska), prema preporukama Evropskog komiteta za ispitivanje osetljivosti bakterija na antibiotike (engl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST) za 2020. godinu (10). Za kontrolu kvaliteta ispitivanja osetljivosti pneumokoka na antibiotike korišćen je referentni soj *S. pneumoniae* ATCC 6303.

Prevakcinalni period je obuhvatio period od 2012. do 2017. godine; postvakcinalni period je definisan kao period od 2019. do 2020. godine; godina u kojoj je uvedena vakcinacija (2018) nije razmatrana kada se evaluirao potencijalni vakcinalni efekat na distribuciju serotipova, tj. kada su se poredili pre- i postvakcinalni periodi.

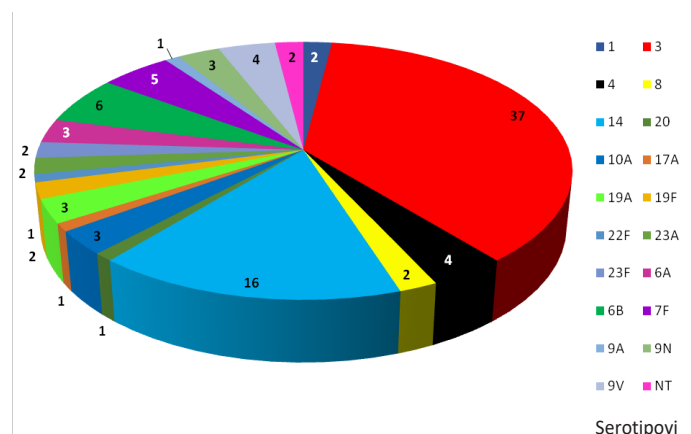
Statistička obrada podataka

Za procenu značajnosti razlike učestalosti korišćeni su χ^2 i Fišerov test. Razlika je bila statistički značajna ukoliko je $p < 0,05$, a visoko značajna ako je $p \leq 0,001$.

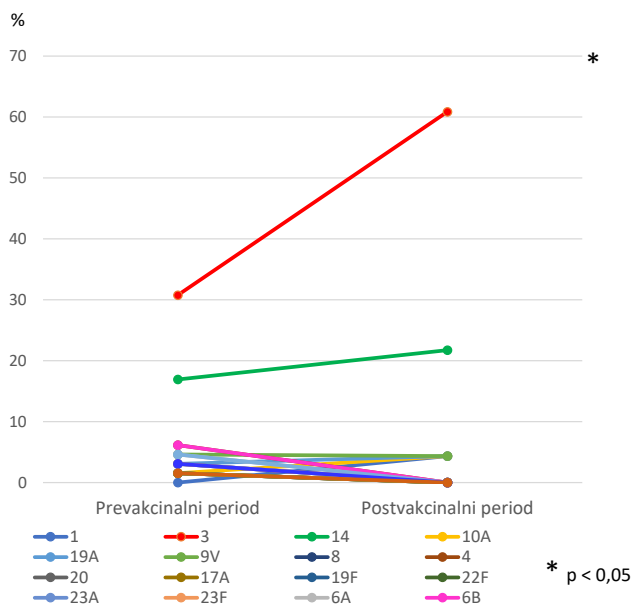
Rezultati

U devetogodišnjem periodu, od 2012. do 2020. godine, u NRL za streptokok je poslato ukupno 100 sojeva *S. pneumoniae* koji su izolovani od pacijenata sa laboratorijski dokazanom pneumokoknom upalom pluća. Ukupno 66 pacijenata je imalo invazivnu pneumokoknu pneumoniju, dok su 34 pacijenta imala neinvazivnu pneumoniju. Distribucija pacijenata po polu je bila sledeća: muški pol 65%, ženski pol 35%. Adultna populacija je činila 79% pacijenata, pri čemu je čak 45% osoba bilo starije od 60 godina, dok je pedijatrijska populacija činila 21% uključenih pacijenata. Rang godina se kretao od 8 meseci do 83 godine.

Tipizacijom pneumokoka identifikovano je ukupno 19 serotipova, od kojih su najčešći bili 3 (37%) i 14 (16%). Učestalost detektovanih serotipova je prikazana u **grafikonu 1**.



izolata (4%) nisu bila pokrivena nijednom dostupnom vakcinom (NT: 17A, 23A i 9A). Promena učestalosti serotipova nakon uvođenja konjugovanih vakcina u nacionalni program imunizacije Republike Srbije prikazana je u **grafikonu 2**.



Grafikon 2. Učestalost detektovanih serotipova *S. pneumoniae* izolovanih od pacijenata sa pneumokoknim pneumonijama u pre- i postvakcinalnom periodu.

Uočen je značajan porast učestalosti serotipa 3 sa 30,8% u prevakcinalnom periodu na 60,8% u postvakcinalnom periodu ($p = 0,0108$).

Učestalost rezistencije izolovanih sojeva pneumokoka na penicilin iznosila je 9%, dok je zastupljenost rezistencije na ceftriakson bila 2%. Zastupljenost različitih kategorija osetljivosti sojeva pneumokoka na ispitivane antimikrobne agense prikazana je u prilogu III, dok su osetljivosti pedijatrijskih i adultnih izolata pneumokoka prikazane u prilogu IV.

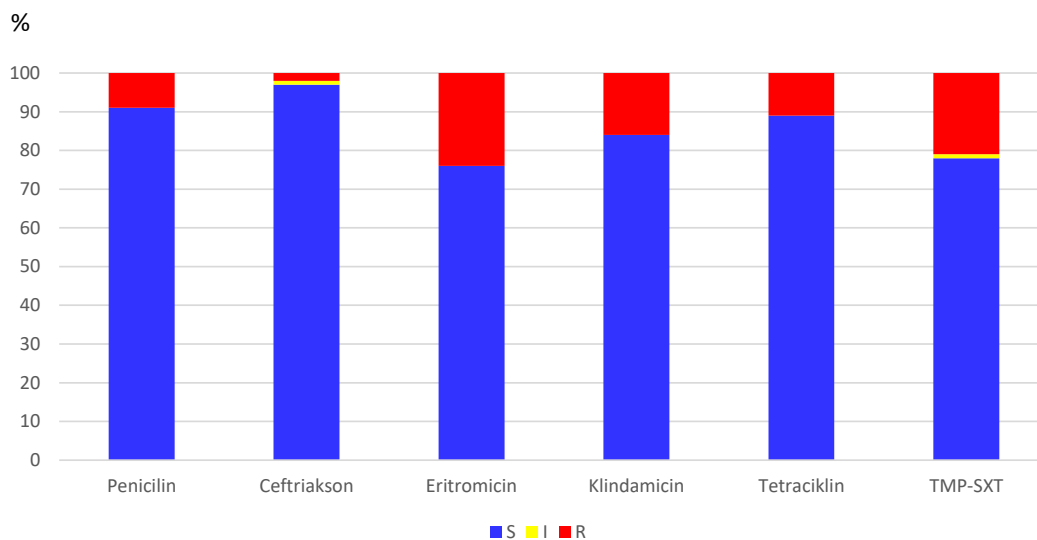
Iako je uočena veća učestalost rezistencije pedijatrijskih izolata u odnosu na adultne za sve testirane antibiotike izuzev na ceftriakson, razlika nije bila statistički značajna (prilog IV). Kod sojeva rezistentnih na penicilin detektovano je ukupno šest serotipova (14, 3, 19F, 6B, 9A i 9V). Sojevi rezistentni na eritromicin su pripadali serotipovima 1, 3, 14, 20, 10A, 19F, 23F, 6A, 6B, 9A, 9V, NT. Najzastupljeniji među njima je bio serotip 14 (29,2%).

Diskusija

Rezultati dobijeni u ovoj studiji ukazuju da je skoro polovina ispitivanih pacijenata bila starija od 60 godina, što je u skladu sa rezultatima drugih istraživanja (11). Najčešći serotipovi koji su identifikovani kod pacijenata sa pneumokoknim pneumonijama (3 i 14) činili su više od polovine detektovanih kapsularnih tipova. Isti serotipovi su prepoznati kao najčešći u brojnim studijama (4).

U posmatranom periodu uočen je dvostruki porast zastupljenosti serotipa 3, što se delom može objasniti činjenicom da PCV-10, koja je jedna od dve vakcine koje se u Srbiji primenjuju u obaveznoj imunizaciji dece starosti do 2 godine, ne pruža zaštitu od ovog serotipa. Ipak, druga konjugovana vakcina, koja je takođe u primeni u našoj zemlji, PCV13, sadrži antigene serotipa 3. Dodatna istraživanja, usmerena na zastupljenost navedenih vakcina u procesu vakcinacije u Srbiji u posmatranom periodu, mogla bi delom da pojasni dobijene rezultate. Porast učestalosti serotipa 3 su zabeležili i drugi autori (12), a Dagan i saradnici (13) su dokazali da imunizacija PCV-13 ne smanjuje nazofaringealno kliconoštvo izazvano ovim serotipom, dok su istraživači iz Danske i Izraela dokazali da se u post-PCV-13 periodu ne detektuje očekivano smanjenje učestalosti serotipa 3 (14, 15). U ovoj studiji samo 4% cirkulišućih sojeva nije bilo pokriveno dostupnim vakcinama, a 2% izolata nije moglo biti tipizirano. Iako je poznato da se u postvakcinalnom periodu uočava porast nevakcinalnih serotipova, u ovoj studiji ta pojava nije registrovana (16). U našem ispitivanju je uočen nezatni pad učestalosti nevakcinalnih serotipova nakon uvođenja obavezne vakcinacije, što je verovatno posledica zastupljenosti relativno malog broja izolata koji datiraju iz postvakcinalnog perioda i kratkog vremenskog intervala koji je protekao od uvođenja vakcina u nacionalni program imunizacije i izolovanja ispitivanih sojeva. Za razliku od rezultata dobijenih u ovoj studiji, koji pokazuju da je samo 10% sojeva bilo pokriveno PPV-23, ali ne i PCV-13 (PPV-23/non-PCV-13), u SAD je tokom 2017/2018. godine kod pacijenata sa pneumokoknim pneumonijama čak 34% sojeva pripadalo navedenoj kategoriji (12). Tri puta manja učestalost ovih sojeva u našoj studiji verovatno je posledica kratkog perioda obavezne PCV imunizacije i manje posledične izmene serotipova koji nastaju usled vakcinalnog pritiska. Rezultati studije sprovedene u Velikoj Britaniji ukazuju da je upravo povećanje sojeva koji su pripadali tzv. PCV-13/non-PCV-7 i NT populaciji dovelo do porasta incidencije pneumokoknih pneumonija u ovoj državi u periodu od 2013. do 2018. godine (17).

Niže učestalosti rezistencije na antibiotike u odnosu na prethodno istraživanje u Srbiji (18, 19) delom se mogu objasniti relativno velikim brojem invazivnih sojeva u ispitivanoj kolekciji, koji su manje izloženi selektivnom pritisku antibiotika od neinvazivnih sojeva. Takođe, u ovu studiju nisu uključeni meningealni izolati za koje se primenjuju rigorozniji kriterijumi za interpretaciju osetljivosti na beta laktamske antibiotike. Mali broj uzoraka i relativna nereprezentativnost ispitivane kolekcije posledica su volonterskog i nesistematičnog slanja sojeva u NRL za streptokok. Najviša učestalost rezistencije testiranih izolata je bila na eritromicin, što je verovatno posledica nekritične primene makrolida u empirijskoj terapiji respiratornih infekcija u Srbiji, posebno onih sa dugim poluvremenom eliminacije, kao što je azitromicin.



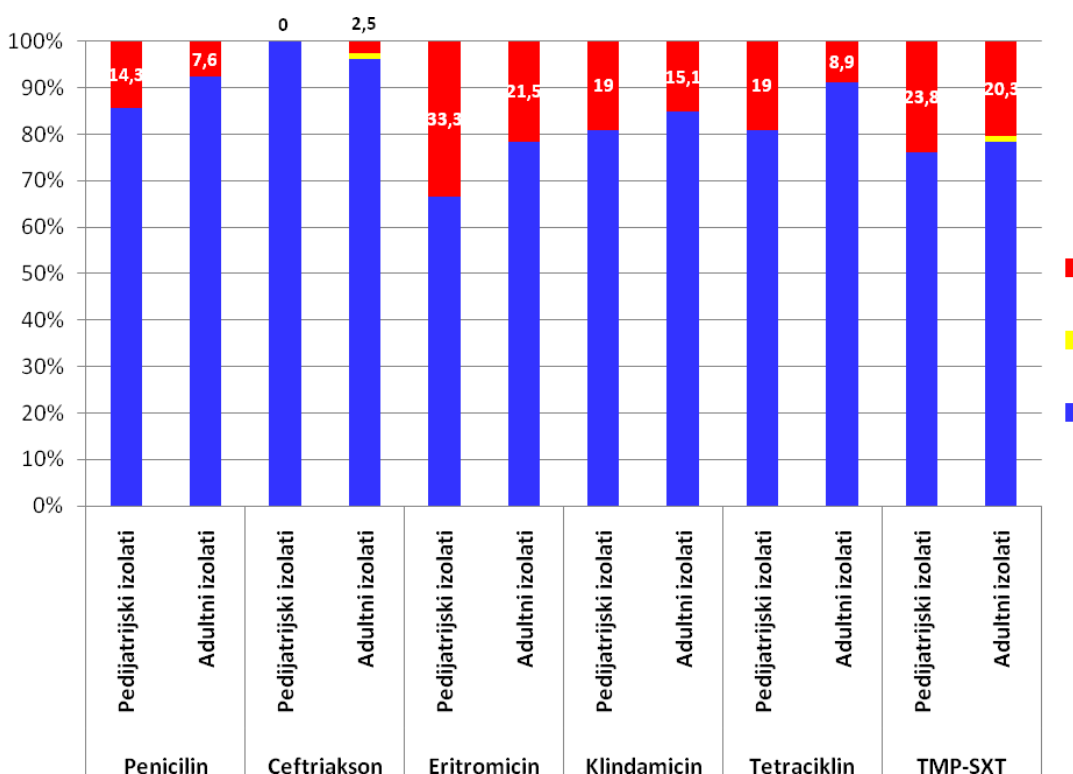
TMP-SXT: trimetoprim-sulfametoksazol

S – osetljiv

I – osetljiv uz povećanu izloženost

R - rezistentan

Grafikon 3. Osetljivost sojeva *S. pneumoniae* izolovanih od pacijenata sa pneumokoknom pneumonijom na antimikrobne agense.



TMP-SXT: trimetoprim-sulfametoksazol

S – osetljiv

I – osetljiv uz povećanu izloženost

R - rezistentan

Grafikon 4. Osetljivost pedijatrijskih (n = 21) i adultnih (n = 79) izolata *S. pneumoniae* na antimikrobne agense.

Zaključak

Seroepidemiologija sojeva pneumokoka izolovanih od pacijenata sa pneumonijom ukazuje da je oko 85% sojeva pripadalo serotipovima zastupljenim u PCV-13 i PPV-23. Dominantni serotip u pedijatrijskoj populaciji je bio 14, a kod odraslih 3. Najveće stope rezistencije su nađene za makrolide (25%) i trimetoprim-sulfametoksazol (21%), a manje od 10% za beta laktamske antibiotike. Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da u našoj zemlji još uvek nije došlo do značajnog selektivnog pritiska imunizacije na populaciju pneumokoka. Dalje praćenje distribucije vakcinalnih i nevakcinalnih tipova, kao i učestalosti rezistencije na antibiotike ukazaće na efekte imunizacije, tj. da li i u kom obimu je došlo do izmene vakcinalnih serotipova i smanjenja učestalosti rezistencije.

Literatura

1. Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat Rev Microbiol*. 2018; 16:355–67.
2. Engholm DH, Kilian M, Goodsell DS, Andersen ES, Kjærgaard RS. A visual review of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Rev*. 2017; 41(6):854–79.
3. File TM. Community-acquired pneumonia. *Lancet*. 2003; 362:1991–2001.
4. Geno KA, Gilbert GL, Song JY, Skovsted IC, Klugman KP, Jones C. et al. Pneumococcal capsules and their types: past, present and future. *Clin Microbiol Rev*. 2015; 28(3):871–99.
5. Falup-Pecurariu O. Lessons learnt after the introduction of the seven valent-pneumococcal conjugate vaccine toward broader spectrum conjugate vaccines. *Biomed J*. 2012; 35:450–6.
6. Jacobs MR, Felmingham D, Appelbaum PC, Grüneberg RN, Alexander Project Group. The Alexander Project 1998-2000: susceptibility of pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 52(2):229–46.
7. File TM Jr. Appropriate use of antimicrobials for drug-resistant pneumonia: focus on the significance of beta-lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis*. 2002; 34 Suppl 1:S17–26.
8. von Gottberg A, de Gouveia L, Tempia S, Quan V, Meiring S, von Mollendorf C, et al. GERMS-SA Investigators. Effects of vaccination on invasive pneumococcal disease in South Africa. *N Engl J Med*. 2014; 371(20):1889–99.
9. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Medical Microbiology: Streptococcus and Enterococcus*. ed. 8. Philadelphia: Elsevier; 2016.
10. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0. Internet. 2020. Available from: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
11. Chalmers JD, Campling J, Dicker A, Woodhead M, Madhava H. A systematic review of the burden of vaccine preventable pneumococcal disease in UK adults. *BMC Pulm Med*. 2016; 16(1):77.
12. Goldblatt D, Miller E. Pneumococcal pneumonia. *Thorax*. 2020; 75(1):6–7.
13. Dagan R, Patterson S, Juergens C, Greenberg D, Givon-Lavi N, Porat N, et al. Comparative immunogenicity and efficacy of 13-valent and 7-valent pneumococcal conjugate vaccines in reducing nasopharyngeal colonization: a randomized double-blind trial. *Clin Infect Dis*. 2013; 57(7):952–62.
14. Harboe ZB, Dalby T, Weinberger DM, Benfield T, Mølbak K, Slotved HC, et al. Impact of 13-valent pneumococcal conjugate vaccination in invasive pneumococcal disease incidence and mortality. *Clin Infect Dis*. 2014; 59(8):1066–73.
15. Ben-Shimol S, Greenberg D, Givon-Lavi N, Schlesinger Y, Somekh E, Aviner S, et al. Early impact of sequential introduction of 7-valent and 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on IPD in Israeli children <5 years: an active prospective nationwide surveillance. *Vaccine*. 2014; 32(27):3452–9.
16. Ladhani SN, Collins S, Djennad A, Sheppard CL, Borrow R, Fry NK, et al. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18(4):441–51.
17. Pick H, Daniel P, Rodrigo C, Bewick T, Ashton D, Lawrence H, et al. Pneumococcal serotype trends, surveillance and risk factors in UK adult pneumonia, 2013–18. *Thorax*. 2020; 75(1):38–49.
18. Gajić I, Mijač V, Ranin L, Andjelković D, Radičević M, Opavski N. Invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Serbia: antimicrobial susceptibility and serotypes. *Srp Arh Celok Lek*. 2013; 141(1–2):48–53.
19. Gajić I, Mijač V, Ranin L, Stanojević M, Lazerević I, Šmitran A, Hadnadev M, Opavski N. Distribution of macrolide resistant genes among isolates of macrolide resistant *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* in Serbia. *Arch. Biol. Sci*. 2014; 66(1):93–8.