

PHÂN BỐ TYPE HUYẾT THANH, TẦN SUẤT MANG GEN ERM(B) VÀ MEF(A) Ở CÁC CHỦNG *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* KHÁNG MACROLIDE THU THẬP TỪ TRẺ DƯỚI 5 TUỔI BỊ VIÊM PHỔI TẠI NGHỆ AN

Bùi Anh Sơn^{1*}, Lê Thị Hồng Hạnh², Nguyễn Thị Thúy Hằng¹, Nguyễn Võ Thị Bình¹, Ngô Thị Hà¹

¹Bệnh viện Sản Nhi Nghệ An

²Bệnh viện Nhi Trung ương

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nghiên cứu này nhằm mục tiêu xác định các type huyết thanh, tần suất mang gen *erm(B)* và *mef(A)* ở các chủng phế cầu kháng kháng sinh macrolide thu thập từ trẻ dưới 5 tuổi bị viêm phổi tại Nghệ An.

Phương pháp: Nghiên cứu mô tả cắt ngang trên 126 chủng phế cầu trong thời gian từ tháng 11/2019 đến tháng 12/2021.

Kết quả: Tám type huyết thanh 6A/B, 9V, 11A, 14, 15A, 19F, 19A, và 23F đã được xác định tại Nghệ An, trong đó type huyết thanh 19A chiếm tỷ lệ khá cao. Sự có mặt của các gen *erm(B)* và *mef(A)* được xác định bằng các phản ứng PCR, tần suất mang gen *erm(B)* và *mef(A)* lần lượt là 92,1% và 57,9%. Tần suất mang ít nhất một trong hai gen này là 95,3% và tần suất mang đồng thời hai gen là 54,8%. Có 6 chủng kháng kháng sinh macrolide không mang gen nào trong số 2 gen *erm(B)* và *mef(A)*, chiếm 4,8%.

Kết luận: Tám type huyết thanh khác nhau của phế cầu đã được xác định tại Nghệ An. 19F, 23F và 19A là phổ biến nhất. Type huyết thanh 19A với tỷ lệ nhiễm cao là một đặc điểm cần được chú ý. Tần suất mang các gen *erm(B)* và *mef(A)* lần lượt là 92,1 và 57,9%.

Từ khóa: Type huyết thanh, *erm(B)*, kháng thuốc, macrolide, *mef(A)*, *Streptococcus pneumoniae*

SEROTYPE DISTRIBUTION AND FREQUENCY OF ERM(B) AND MEF(A) GENES IN MACROLIDE-RESISTANT *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* STRAINS COLLECTED FROM CHILDREN UNDER 5 YEARS OLD WITH PNEUMONIA IN NGHE AN

Bui Anh Son¹, Le Thi Hong Hanh², Nguyen Thi Thuy Hang¹, Nguyen Vo Thi Binh¹, Ngo Thi Ha¹

¹Nghe An Obstetrics and Pediatrics Hospital

²Vietnam National Children's Hospital

Objective: This study aims to determine the serotypes and frequency of carrying *erm(B)* and *mef(A)* genes in macrolide antibiotic-resistant pneumococcal strains collected from children under 5 years old with pneumonia in Nghe An.

Methods: It was a descriptive cross-sectional study on 126 pneumococcal strains from November 2019 to December 2021.

Results: Eight serotypes 6A/B, 9V, 11A, 14, 15A, 19F, 19A, and 23F were identified in Nghe An, of which serotype 19A accounts for a high proportion. The presence of *erm(B)* and *mef(A)* genes was determined by PCR reactions, the frequency of carrying *erm(B)* and

Nhận bài: 28-3-2023; Phản biện: 12-4-2024; Chấp nhận: 24-4-2024

Người chịu trách nhiệm: Bùi Anh Sơn

Email: drsonres@gmail.com

Địa chỉ: Bệnh viện Sản Nhi Nghệ An

mef(A) genes was 92.1% and 57.9%, respectively. The frequency of carrying at least one of these two genes is 95.3% and the frequency of carrying two genes simultaneously is 54.8%. There are 6 macrolide antibiotic-resistant strains that do not carry any of the erm(B) and mef(A) genes, accounting for 4.8%.

Conclusion: Eight different serotypes of pneumococcus were identified in Nghe An. 19F, 23F and 19A are the most common. Serotype 19A with its high infection rate is a feature that needs attention. The frequency of carrying the erm(B) and mef(A) genes is 92.1 and 57.9%, respectively.

Keywords: serotype, erm(B), drug resistance, macrolide, mef(A), *Streptococcus pneumoniae*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*, pneumococcus) hay phế cầu là nguyên nhân gây ra bệnh viêm phổi phế cầu. Đây là một vi khuẩn gram dương, kỵ khí và là một mầm bệnh quan trọng gây ra viêm phổi cộng đồng, viêm xoang, viêm tai giữa cũng như các nhiễm trùng xâm lấn như viêm màng não, nhiễm khuẩn huyết với tỷ lệ mắc và tử vong cao ở trẻ em dưới 5 tuổi. Theo ước tính của Wahl và CS (2018), các bệnh do phế cầu gây tử vong cho khoảng 317.300 trẻ em dưới 5 tuổi mỗi năm, xảy ra chủ yếu ở các nước có thu nhập thấp. Hiện tại, dựa trên cấu trúc kháng nguyên polysaccharide trên màng tế bào, phế cầu được chia ra thành 90 type huyết thanh khác nhau [1]. Các polysaccharide trên màng tế bào là yếu tố độc lực quan trọng của *S. pneumoniae* và trong số các type huyết thanh của phế cầu, các type huyết thanh từ 6A-6D là nguyên nhân phổ biến nhất gây ra các bệnh do phế cầu trên toàn cầu. Các nghiên cứu dịch tễ trên khắp thế giới đã chỉ ra rằng, phân bố của các type huyết thanh của phế cầu thay đổi theo độ tuổi và khu vực địa lý.

Vào những năm 80-90 của thế kỷ trước, tình trạng kháng penicilin ở phế cầu trở nên rất phổ biến nên các kháng sinh nhóm macrolide đã được lựa chọn sử dụng thay thế. Tuy nhiên, chính việc sử dụng các kháng sinh macrolide một cách rộng rãi dẫn tới tình trạng kháng kháng sinh macrolide lan rộng ở vi khuẩn này. Tình trạng kháng thuốc của phế cầu ngày càng gia tăng, nhất là ở châu Á, khiến cho việc sử dụng kháng sinh theo kinh nghiệm trở nên ít hiệu quả. Ở Việt

Nam, tỷ lệ kháng kháng sinh nhóm macrolide ở phế cầu khá cao (trên 75%) [2] và một số gen như erm(A), erm(B), mef(A) và msr(D) đã được khảo sát, phân tích ở các chủng phế cầu gây bệnh [3,4]. Nghiên cứu này nhằm mục tiêu xác định các type huyết thanh và tần suất mang gen erm(B) và mef(A) ở các chủng phế cầu kháng kháng sinh macrolide thu thập từ trẻ dưới 5 tuổi bị viêm phổi tại Nghệ An

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phân lập và định danh vi khuẩn *S. pneumoniae*

Tổng số 126 chủng phế cầu được phân lập từ các mẫu dịch tỵ hầu của trẻ em bị viêm phổi có độ tuổi từ 2 đến 59 tháng tại Bệnh viện Sản Nhi Nghệ An trong thời gian từ tháng 11 năm 2019 đến tháng 3 năm 2021. Các mẫu dịch tỵ hầu của mỗi bệnh nhân được lấy bởi các điều dưỡng và được chuyển tới phòng xét nghiệm vi sinh trong vòng 2 giờ để phân lập vi khuẩn *S. pneumoniae*. Tất cả các mẫu bệnh phẩm được ủ ở 37°C trên đĩa thạch chứa 5% máu cừu (Himedia, India) trong điều kiện có 5% CO₂ trong thời gian 18-24 giờ. Những mẫu không mọc khuẩn lạc sau 24 giờ tiếp tục được theo dõi thêm 24 giờ. Nếu tiếp tục không mọc khuẩn lạc thì kết luận là âm tính. Những mẫu mọc khuẩn lạc nghi ngờ sẽ được đem định danh bằng hình thái học (nhuộm gram, thử nghiệm tan máu, và test nhạy cảm với optochin), bằng hệ thống VITEK® 2 Compact (bioMérieux, North Carolina 27712, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và bằng PCR với mỗi đặc hiệu theo như một nghiên cứu trước. Tất cả các chủng sau định

danh được bảo quản ở -80°C trong môi trường chứa trypticase soy broth (Merck, Germany), 20% glycerol (Merck, Germany) and 10% huyết thanh ngựa cho tới khi tiếp tục các phân tích tiếp theo.

2.2. Xác định các type huyết thanh của phế cầu

DNA tổng số của phế cầu được tách chiết từ khuẩn lạc sau nuôi cấy bằng bột kit G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology, Korea) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tất cả các chủng được giám định chắc chắn là phế cầu bằng phản ứng PCR với cặp mỗi đặc hiệu cpsA-F (5'-GCA GTA CAG CAG TTT GTT GGA CTG ACC-3') và cpsA-R (5'-GAA TAT TTT CAT TAT CAG TCC CAG TC-3') (Integrated DNA Technologies, USA) khuếch đại gen đích cpsA (1). Sau đó, type huyết thanh của phế cầu được xác định bằng các phản ứng PCR đa môi (mPCR) sử dụng 21 cặp mỗi đặc hiệu cho 21 type huyết thanh phổ biến nhất như mô tả trong các nghiên cứu trước [1].

2.3. Xác định tình trạng kháng thuốc

Các chủng vi khuẩn được xác định mức độ nhạy cảm với các kháng sinh, trong đó có các kháng sinh azithromycin, clarithromycin, erythromycin thuộc nhóm macrolide bằng hệ thống VITEK® 2 Compact theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Thông qua nồng độ ức chế tối thiểu (MIC), các chủng phế cầu được phân loại nhạy, trung gian, kháng với các kháng sinh dựa theo tài liệu M100 của Viện Kiểm chuẩn lâm sàng và Xét nghiệm Hoa Kỳ năm 2020 [6]. Chủng *S. pneumoniae* ATCC 49619 được sử dụng làm chủng chuẩn tham chiếu. Các chủng được khẳng định là phế cầu và kháng với ít nhất một trong 3 kháng sinh azithromycin, clarithromycin, erythromycin sẽ được đưa vào xác định tần suất có mặt của các gen erm(B) và mef(A).

2.4. Giải trình tự gen 16S

Sử dụng 2 mỗi 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') and 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'), để khuếch đại gen 16S của phế cầu (5). Sản phẩm PCR với 2 mỗi này của 22 chủng khác nhau được gửi tới Công ty Apical Scientific Sdn. Bhd (Selangor, Malaysia) để tinh sạch và giải trình tự. Trình tự thu được của 2 chiều được ghép cặp

và so sánh với ngân hàng gen để giám định một lần nữa là phế cầu. Trình tự của 22 chủng này đã được gửi, đăng ký và cấp mã số trên genbank từ MW672550 đến MW672562 và từ MZ007491 đến MZ007499.

2.5. Xác định tần suất mang gen erm(B) và mef(A) ở phế cầu

Các phản ứng PCR được sử dụng để xác định tần suất mang gen erm(B) và mef(A) ở các chủng phế cầu kháng kháng sinh macrolide. Cụ thể, sự có mặt của gen erm(B) ở các chủng phế cầu được xác định bằng cặp mỗi ermB-F (5'-TGG TAT TCC AAA TGC GTA ATG-3') và ermB-R (5'-CTG TGG TAT GGC GGG TAA GT-3') cho sản phẩm có kích thước 745 bp. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR như sau: một chu kỳ 95°C trong 5 phút; tiếp theo là 35 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước 94°C trong 45 giây, 61°C trong 45 giây và 72°C trong 90 giây; cuối cùng là 1 chu kỳ 72°C trong 10 phút. Sự có mặt của gen mef(A) được xác định bằng cặp mỗi mef(A)-F (5'-AGT ATC ATT AAT CAC TAG TGC-3') và mef(A)-R (5'-TTC TTC TGG TAC TAA AAG TTG-3') cho sản phẩm kích thước 348 bp. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR như sau: một chu kỳ 95°C trong 5 phút; tiếp theo là 35 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước 94°C trong 30 giây, 50°C trong 30 giây và 72°C trong 30 giây; cuối cùng là 1 chu kỳ 72°C trong 10 phút.

2.6. Phân tích số liệu

Các số liệu nghiên cứu được nhập liệu và phân tích bằng phần mềm thống kê IBM SPSS 20.0 được phát triển bởi IBM Corp. (Armonk, NY, USA). Các test kiểm định Chi-squared và Fisher's exact được thực hiện để kiểm tra mức ý nghĩa của các dữ liệu. Giá trị p nhỏ hơn 0,05 được nghĩ tới là có ý nghĩa thống kê. Trình tự gen 16S của các chủng phế cầu được so sánh với các trình tự tham chiếu trên ngân hàng gen sử dụng công cụ BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.7. Đạo đức trong nghiên cứu

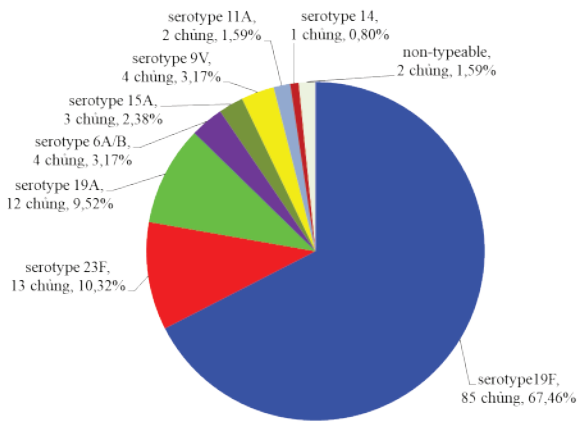
Quy trình nghiên cứu được chấp thuận bởi Hội đồng y đức của Viện Sốt rét – Ký sinh trùng và Côn trùng Trung ương vào tháng 3 năm 2018 tại quyết định số 225/QĐ-VSR. Ngoài ra, nghiên cứu

này được thực hiện dựa trên các nguyên tắc của tuyên bố Helsinki về đạo đức trong nghiên cứu.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Type huyết thanh

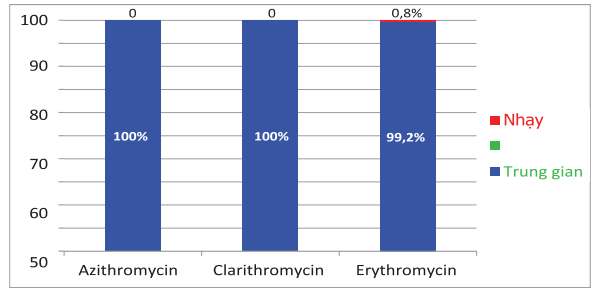
Toàn bộ 126 chủng phế cầu có kết quả nuôi cấy dương tính đều cho kết quả PCR có mang cpsA. 22 trình tự gen 16S của các chủng khác nhau đã được đăng ký và cấp mã số trên ngân hàng gen từ MW672550 đến MW672562 và từ MZ007491 đến MZ007499.



Hình 1. Phân bố các kiểu gen của phế cầu

Bảng 5 phản ứng PCR đa môi, trong số 126 chủng *S. pneumoniae*, 124 (98,41%) chủng đã xác định được type huyết thanh với 8 type huyết thanh khác nhau đã được xác định và mỗi bệnh nhân chỉ nhiễm 1 type huyết thanh. Còn lại 2 chủng không thể xác định được type huyết thanh chiếm 1,59%. Type huyết thanh phổ biến nhất là 19F (90 chủng; 67,46%), tiếp theo là 23F (15 chủng; 10,32%), 19A (12 strains; 9,52%), 6A/B (4 chủng; 3,17%), 15A (4 chủng; 2,38%), 9V (4 chủng; 3,17%), 11A (2 chủng; 1,59%) và 14 (1 chủng, 0,80%). Phân bố type huyết thanh của phế cầu được trình bày trong Hình 1.

100% các chủng phế cầu trong nghiên cứu này kháng đồng thời 2 loại kháng sinh Azithromycin và clarithromycin. Đối với kháng sinh erythromycin, 99,2% các chủng (125 chủng) xuất hiện kháng, chỉ 0,8% (1 chủng) nhạy cảm (Hình 2)



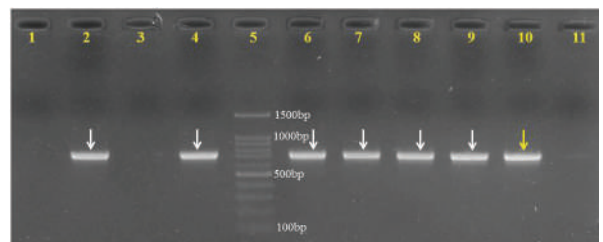
Hình 2. Kết quả xác định tình trạng kháng thuốc nhóm macrolide

3.2. Tần suất mang gen *erm(B)* và *mef(A)*

Bảng 1. Tần suất mang gen *erm(B)* và *mef(A)* của các chủng phế cầu kháng kháng sinh nhóm macrolide (n=126).

Kiểu mang gen	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Mang <i>erm(B)</i>	116	92,1
Mang <i>mef(A)</i>	73	57,9
Mang đồng thời 2 gen <i>erm(B)</i> và <i>mef(A)</i>	69	54,8
Mang gen <i>erm(B)</i> , không mang gen <i>mef(A)</i>	47	37,3
Mang gen <i>mef(A)</i> , không mang gen <i>erm(B)</i>	4	3,2
Không mang cả 2 gen <i>erm(B)</i> và <i>mef(A)</i>	6	4,8

Tần suất mang gen *erm(B)* và *mef(A)* của các chủng phế cầu kháng kháng sinh macrolide lần lượt là 92,1 và 57,9%. Tần suất mang đồng thời 2 gen này là 54,8% và không mang gen nào trong 2 gen này là 4,8%.



Hình 3. Minh họa kết quả chạy PCR phát hiện gen *erm(B)* ở phế cầu.

Trong hình 3, giếng 1 và 3: chủng phế cầu không mang gen *erm(B)*; giếng 2, 4, 6-9: chủng phế cầu mang gen *erm(B)*; giếng 5: thang ADN

chuẩn 100-1500 bp; giếng 10: chứng dương; giếng 11: chứng âm.



Hình 4. Minh họa kết quả chạy PCR phát hiện gen *mef(A)* ở phế cầu.

Trong hình 4, giếng 1 và 2: chủng phế cầu mang gen *mef(A)*; giếng 3: thang ADN chuẩn 100-1500 bp; giếng 4-7: chủng phế cầu không mang gen *mef(A)*; giếng 8: chứng dương; giếng 9: chứng âm.

IV. BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tại Nghệ An 8 type huyết thanh 6A/B, 9V, 11A, 14, 15A, 19F, 19A, và 23F đã được phát hiện ở trẻ dưới 5 tuổi chưa được tiêm vắc xin. Đáng lưu ý là type huyết thanh 19A chiếm tỷ lệ khá cao. Phân bố type huyết thanh trong nghiên cứu này tương tự như các nghiên cứu trước tại miền Nam Việt Nam, các quốc gia trong khu vực Asean và Đài Loan [7-9]. Các type huyết thanh 6B, 23F và 19F phổ biến nhất ở trẻ em tại Nhật Bản, trong khi các type huyết thanh 1, 5, 6ABC, và 19F lại chiếm ưu thế tại Hy Lạp [10,11]. Kết quả từ các nghiên cứu khác nhau chỉ ra rằng, phân bố các type huyết thanh của phế cầu thay đổi phụ thuộc vào quần thể, khu vực địa lý và thời gian nghiên cứu. Do vậy, cần thêm các nghiên cứu để xác định phân bố các type huyết thanh ở các khu vực địa lý khác nhau để cung cấp các thông tin cần thiết cho việc phát triển vắc xin phù hợp tại Việt Nam.

Tần suất mang gen *erm(B)* và *mef(A)* của các chủng phế cầu kháng kháng sinh macrolide tương ứng là 92,1% và 57,9%. Tất cả các chủng mang gen *erm(B)* và/hoặc *mef(A)* đều kháng ít nhất một trong số các kháng sinh azithromycin, clarithromycin và erythromycin. Tần suất mang ít nhất một gen và mang đồng thời 2 gen *erm(B)* và *mef(A)* ở các chủng phế cầu kháng kháng sinh

macrolide trong nghiên cứu này khá cao (95,2% và 54,8%).

Có 6 chủng kháng kháng sinh macrolide ở nghiên cứu này không mang gen nào trong số 2 gen *erm(B)* và *mef(A)*, chiếm 4,8%. Như đã đề cập ở trên, có nhiều gen khác nhau tham gia vào cơ chế kháng kháng sinh nhóm macrolide của phế cầu như các gen thuộc họ *erm* là *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *erm(E)* nằm trên plasmid của vi khuẩn và các gen thuộc họ *mef* và *msr* tạo ra các kênh bơm thuốc ra khỏi vi khuẩn. Do vậy, 6 chủng không mang cả 2 gen *erm(B)* và *mef(A)* rất có thể sẽ mang một hoặc nhiều gen khác trong số các gen *erm(A)*, *erm(C)*, *erm(E)* hoặc *mef* và *msr*. Do đó, mở rộng nghiên cứu xác định sự có mặt của các gen khác là rất cần thiết để làm sáng tỏ cơ chế kháng kháng sinh macrolide ở phế cầu.

Dữ liệu về các gen liên quan đến kháng thuốc macrolide cùng với dữ liệu kháng thuốc là căn cứ quan trọng để lựa chọn kháng sinh phù hợp sử dụng trong thực hành lâm sàng điều trị bệnh do phế cầu. Tuy nhiên tại Việt Nam, vấn đề này chưa thực sự được quan tâm nên dữ liệu còn rất khiêm tốn. Vì vậy, cần có thêm những nghiên cứu khác trên quy mô rộng hơn về tình trạng kháng thuốc, tần suất mang các gen liên quan đến kháng thuốc của phế cầu để có thêm cơ sở đưa ra các khuyến cáo sử dụng kháng sinh macrolide trên lâm sàng một cách phù hợp, hiệu quả.

V. KẾT LUẬN

Tám type huyết thanh khác nhau của phế cầu đã được xác định tại Nghệ An. Trong đó, 19F, 23F và 19A là phổ biến nhất. Type huyết thanh 19A với tỷ lệ nhiễm cao là một đặc điểm cần được chú ý.

Tần suất mang các gen *erm(B)* và *mef(A)* lần lượt là 92,1 và 57,9%, tần suất mang ít nhất 1 trong 2 gen là 95,3% và mang đồng thời 2 gen là 54,8%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Beheshti M, Jabalameli F, Feizabadi MM et al.** Molecular characterization, antibiotic resistance pattern and capsular types of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolated

- from clinical samples in Tehran, Iran. *BMC Microbiol* 2020;20(1):167
- 2 **Nguyễn Đăng Quyết** và cs. Tình hình đề kháng kháng sinh của phế cầu và kết quả điều trị viêm phổi do phế cầu ở trẻ em tại Bệnh viện Nhi Trung ương. *Tạp chí Nghiên cứu và Thực hành Nhi khoa* 2021;5(4):27-34.
 - 3 **Tống Thị Hà**. Nghiên cứu sự lưu hành các tuýp huyết thanh và kiểu gen kháng kháng sinh của *Streptococcus pneumoniae* gây bệnh bằng kỹ thuật PCR đa mồi tại một số địa phương ở Việt Nam. Luận án tiến sỹ, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội 2017.
 - 4 **Lê Văn Duyệt, Trần Thị Giáng Hương, Nguyễn Vũ Trung**. Phát hiện gen và đột biến kháng erythromycin ở các chủng *Streptococcus pneumoniae*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam* 2017;19(8):11-18.
 - 5 **Miller CS, Handley KM, Wrighton KC et al.** Short-read assembly of full-length 16S amplicons reveals bacterial diversity in subsurface sediments. *PLoS One* 2013;8(2):e56018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056018>
 - 6 **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, CLSI Supplement M100. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>.
 - 7 **Vo TT, Phan T, Ngo HTM et al.** Antibiotic susceptibility of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in southern Vietnam. *International Journal of Infectious Diseases* 2020;101:53-54. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.09.172>
 - 8 **Jauneikaite E, Jefferies JM, Hibberd M et al.** Prevalence of *Streptococcus pneumoniae* serotypes causing invasive and non-invasive disease in South East Asia: A review. *Vaccine* 2012;30(24):3503-3514. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.03.066>
 - 9 **Wu CJ, Lai JF, Huang IW et al.** Serotype Distribution and Antimicrobial Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in Pre- and Post- PCV7/13 Eras, Taiwan, 2002–2018. *Front Microbiol* 2020;11:557404. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.557404>
 - 10 **Sakata H**. Invasive pneumococcal diseases in children in Hokkaido, Japan from April 2000, to March 2015 (2016). *J Infect Chemother* 2016;22(1):24-26. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2015.09.007>
 - 11 **El-Kholy A, Badawy M, Gad M et al.** Serotypes and Antimicrobial Susceptibility of Nasopharyngeal Isolates of *Streptococcus pneumoniae* from Children Less Than 5 Years Old in Egypt. *Infect Drug Resist* 2020;13:3669-3677. <https://doi.org/10.2147/idr.s250315>