

Estandarización de dos pruebas de reacción de polimerasa en cadena múltiple en tiempo real (qPCR) para el diagnóstico de meningitis bacteriana y la detección de serogrupos de *Neisseria meningitidis*

Standardization of two multiplex real-time PCRs for the diagnosis of bacterial meningitis and detection of *Neisseria meningitidis* serogroups

Anika Eca^{1,2}, Edison A. Rivera-Fernández^{1,2}, Brayan E. Gonzales^{1,2}, David Durand^{1,2} y Theresa J. Ochoa^{1,2,3}

¹Instituto de Medicina Tropical "Alexander von Humboldt", Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

²Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

³Facultad de Medicina, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

Financiamiento: Laboratorio Pfizer

Conflictos de interés: Los autores declaran que no existen conflictos de interés. El Laboratorio Pfizer no tuvo participación en el diseño del estudio, la recolección o análisis de los datos, ni en la preparación o revisión del manuscrito.

Recibido: 19 de mayo de 2025 / Aceptado: 16 de octubre de 2025

Resumen

Introducción: La meningitis bacteriana es una infección neurológica grave que afecta principalmente a niños, causada principalmente por *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. En Perú no existe vigilancia de *N. meningitidis* y sus serogrupos. **Métodos:** Se estandarizó una RPC múltiple en tiempo real (qPCR), con sondas Taqman, para la detección de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae*. Además, tres qPCR dúplex con SYBR Green para los seis serogrupos más importantes de *N. meningitidis*, utilizando ADN de cepas control ATCC. **Resultados:** El qPCR múltiple mostró eficiencias de amplificación entre 100,2% y 109,1%, con un límite de detección de una copia de genoma/reacción para cada bacteria. Los qPCR dúplex permitieron diferenciar los serogrupos mediante el análisis de temperaturas melting. **Conclusiones:** Se estandarizaron dos pruebas de qPCR para el estudio etiológico de la meningitis bacteriana, facilitando el diagnóstico oportuno y la vigilancia epidemiológica en estudios e intervenciones de salud pública.

Palabras clave: qPCR multiplex; serogrupos; eficiencias; meningitis bacteriana.

Abstract

Introduction: Bacterial meningitis is a serious neurological infection that mainly affects children, caused primarily by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. In Peru, there is no surveillance system for *Neisseria meningitidis* and its serogroups. **Methods:** A multiplex real-time PCR (qPCR) assay using Taqman probes was standardized for the detection of *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, and *H. influenzae*. Additionally, three duplex SYBR Green-based qPCR assays were performed to detect the six most significant *Neisseria meningitidis* serogroups, using DNA from ATCC reference strains. **Results:** The multiplex qPCR assay showed amplification efficiencies between 100.2% and 109.1%, with a detection limit of one genome copy/reaction for each bacterium. The duplex qPCR assays made it possible to differentiate serogroups using a temperature melting analysis. **Conclusions:** Two qPCR assays were standardized for the etiological study of bacterial meningitis, enabling prompt diagnosis and supporting epidemiological surveillance in public health studies and interventions.

Keywords: multiplex qPCR; serogroups; efficiency; bacterial meningitis.

Correspondencia a:

Theresa J. Ochoa
theresa.ochoa@upch.pe

Introducción

La meningitis bacteriana es una infección grave del sistema nervioso de gran relevancia principalmente en niños¹, siendo principalmente causada por *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, y *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib)². Tiene una alta mortalidad, especialmente en niños menores de cinco años; presenta una incidencia entre 2,6 a 6 casos por cada 100.000 habitantes³. El cultivo microbiológico del líquido cefalorraquídeo (LCR)⁴ es la metodología de elección para la identificación de los agentes etiológicos de la meningitis bacteriana; no obstante, el tiempo para obtener el resultado final puede prolongarse hasta más de 36 horas.

Además, la sensibilidad del cultivo disminuye por la administración previa de antibacterianos, lo que se traduce en una discrepancia entre las muestras clínicas con sospecha de meningitis bacteriana y aquellas confirmadas por cultivo⁵. En Perú, si bien la implementación de las vacunas contra *H. influenzae* tipo b y las neumocócicas conjugadas ha disminuido la incidencia de meningitis bacteriana, no se dispone de un seguimiento sistemático de la meningitis por *N. meningitidis*, así como la distribución de sus serogrupos circulantes⁶. La serotipificación es crucial en la vigilancia epidemiológica, dada su distribución geográfica y su asociación a brotes epidémicos⁷ y para la introducción de vacunas contra *N. meningitidis* en nuestro país.

Con el fin de mejorar el diagnóstico microbiológico de la meningitis bacteriana en Perú, consideramos necesario disponer de herramientas diagnósticas rápidas, sensibles y específicas. Si bien existen paneles moleculares comerciales para el diagnóstico de meningitis/encefalitis con alta sensibilidad y especificidad, su costo elevado limita su uso rutinario en hospitales públicos.

El objetivo de nuestro estudio fue estandarizar una prueba de diagnóstico molecular de bajo costo en base a una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

múltiple (qPCR multiplex) para la detección de las tres principales especies causantes de meningitis bacteriana y la identificación de serogrupos de *N. meningitidis*.

Material y Métodos

Diseño experimental

Se desarrollaron dos pruebas qPCR, la primera fue una amplificación múltiple usando sondas para *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae*, en el que se emplearon los partidores para los genes *SodC*, *LytA* y *Hpd*; respectivamente (Tabla 1). La segunda qPCR fue para la tipificación de seis serogrupos de *N. meningitidis*; se desarrollaron tres dúplex en base a SYBR Green empleando los primers *SerA* (*sacC*), *B* (*siaD*), *C* (*SynE*), *Y* (*siaD*), *W* (*siaD*) y *X* (*xcbB*) a partir de muestras ATCC (Tabla suplementaria 1).

Cepas control

Se emplearon aislados estándares de *N. meningitidis* serogrupo A (ATCC 13077), serogrupo B (ATCC 13090), serogrupo C (ATCC 13102), serogrupo W135 (ATCC M7034), serogrupo X (ATCC M08210) y serogrupo Y (ATCC 35561), proporcionados por los Centers for Disease Control and Prevention (CDC – USA). Aislados de *S. pneumoniae* (cepa D39 / NCTC 7466) y *H. influenzae* (ATCC 10211) fueron proporcionados por el Laboratorio de Infectología Pediátrica - UCPH.

Reactivación de cepas bacterianas. Las cepas estándares fueron reactivadas en caldo Brain Heart Infusion (BHI) a una atmósfera de 5% CO₂ a 37°C durante 18 h. Las suspensiones bacterianas de *S. pneumoniae* y serogrupos de *N. meningitidis* fueron sembradas en agar sangre (*Trypto-Casein Soy Agar* suplementado con 5% de sangre de carnero)², mientras que *H. influenzae* fue sembrada en agar chocolate a una atmósfera de 5% CO₂ por 24 h⁹.

Tabla 1. Primers (o cebadores) utilizados para la detección de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae* y concentraciones finales.

Bacterias	Gen	Primer	Secuencia (5' a 3')	pb	[Concentración]/ reacción	Referencia
<i>N. meningitidis</i> (ATCC 13102)	<i>sodC</i>	<i>sodC-F</i>	GCACACTTAGGTGATTACCTGCAT	128	50 nM	(Peletiri et al., 2021)
		<i>sodC-R</i>	CCACCCGTGTGGATCATAATAGA	128	50 nM	
		<i>sodC-P</i>	5'FAM-CATGATGGCACAGCAACAAATCCTGTT-3'-BHQ1	-	50 nM	
<i>S. pneumoniae</i> (cepa D39 / NCTC 7466)	<i>lytA</i>	<i>lytA-F</i>	ACGCAATCTAGCAGATGAAGCA	75	100 nM	(Ouattara et al., 2019)
		<i>lytA-R</i>	TCGTGCGTTTAATTCAGCT	75	100 nM	
		<i>lytA-P</i>	5'-Cy5-TGCCGAAACGC"T"TGATACAGGGAG-3'-SpC6 "T"=BHQ1	-	50 nM	
<i>H. influenzae</i> (ATCC 10211)	<i>Hpd</i>	<i>F729-F</i>	AGA TTG GAA AGA AAC ACA AGA AAA AGA	113	200 nM	(Peletiri et al., 2021)
		<i>R819-R</i>	CAC CAT CGGCAT ATT TAA CCA CT	113	700 nM	
		<i>Pbr762IBB-P</i>	5'-(HEX)-AAA CAT CCA ATC GTA ATT ATA G-(BHQ1)	-	100 nM	

F: Primer forward. R: Primer Reverse. P: Sonda.

Extracción y cuantificación de ADN genómico. La extracción de ADN se realizó empleando el *kit* comercial DNAmicroprep® (ZymoBIOMICS, US). La cuantificación y calidad del ADN extraído se determinó empleando Nanodrop 2000® (Thermo Fisher Scientific, US). La pureza del ADN se estimó midiendo la relación entre los valores de absorbancia 260-280 μ m y 260-230 μ m, considerando una relación 1,8-2,0 y 1,8-2,2; respectivamente^{10,11}. La concentración inicial medida en número de copias del genoma fue determinada convirtiendo a pares de bases (pb) por la concentración de nanogramos (ng) obtenido, según fórmula publicada¹². A partir de esta conversión, se determinó la cantidad de ADN necesaria para preparar una solución inicial de 1×10^6 copias del genoma por reacción, utilizada en las diluciones seriadas para la evaluación del límite de detección.

Evaluación de las condiciones de PCR en tiempo real

La evaluación de las condiciones ideales de la qPCR en base a sondas se realizó empleando el *kit* comercial iTaq Universal Probes Supermix® (BIO-RAD, USA) y la de qPCR en base a SYBR green, con SsoAdvanced Universal SYBER Green Supermix® (BIO-RAD, USA). En ambas se utilizó el termociclador CFX96® (BIO-RAD, USA).

Evaluación del límite de detección y eficiencia. Se evaluó el límite de detección de ADN de las bacterias utilizadas en el tríplex, en el que se prepararon diluciones seriadas 1:10 del ADN de las cepas de referencia de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae* (Serie: 1×10^6 – 1×10^0 copias del genoma/reacción). El ensayo se realizó por triplicado en tres reacciones separadas. La eficiencia de amplificación se determinó a partir de la pendiente de la curva estándar generada con los valores de umbral de ciclo (Ct) de cada dilución, utilizando la ecuación $E = (10^{-1/slope}) - 1) \times 100$ ^{13,14}, y fue calculada con el software CFX Manager Dx (BIO-RAD, USA). El

coeficiente de determinación (R^2) se calculó para evaluar la linealidad del ensayo.

Diseño de qPCR y optimización en ensayos dúplex

Se diseñó una qPCR para los serogrupos de *N. meningitidis* (A, B, C, Y, W y X), evaluando sus temperaturas de fusión (Tm): *SerA* (79,6 °C), *SerB* (76,6 °C), *SerC* (80,4 °C), *SerW* (78,4 °C), *SerX* (81,6 °C) y *SerY* (78,4 °C). Para optimizar tiempo y recursos, se realizaron tres ensayos dúplex (A/B, C/W, X/Y) en lugar de seis individuales, considerando las Tm en las señales de amplificación.

El estudio se realizó en la Unidad de Investigación de Infectología Pediátrica – Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), Lima, Perú, durante el período de julio de 2023 a julio de 2024.

Consideraciones éticas

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la UPCH como exoneración de revisión.

Resultados

Se identificaron las concentraciones óptimas de partidores y sondas para la detección simultánea de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae* mediante qPCR tríplex, las cuales permitieron una amplificación eficiente y específica de cada blanco (Tabla 1).

La amplificación de los genes *sodC*, *lytA* y *hpd* fue consistente y sin interferencias al ser evaluada en formatos single, dúplex y tríplex, mostrando señales comparables entre los diferentes esquemas. Se obtuvo una amplificación específica y robusta a una temperatura de hibridación óptima de 62 °C durante 30 segundos, condición que se aplicó para el ensayo tríplex final (Figura 1, Tabla suplementaria 2).

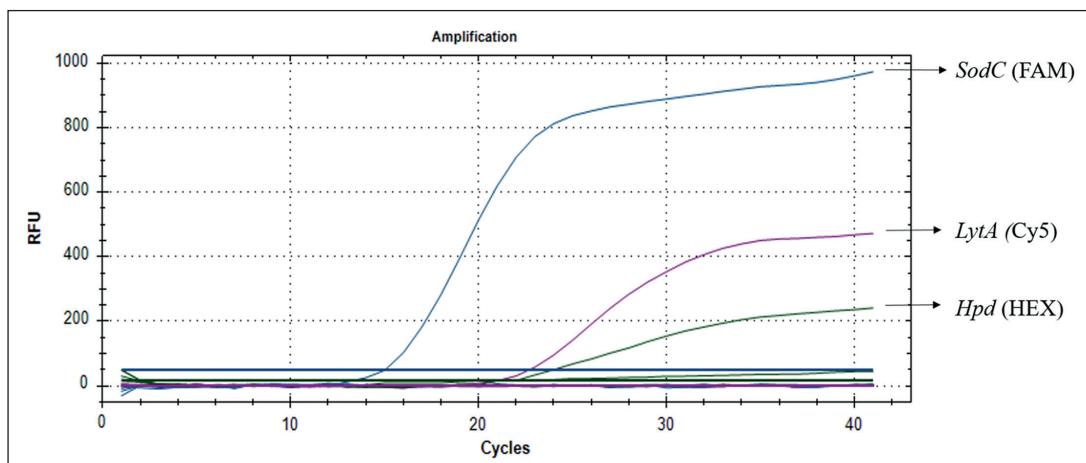


Figura 1. PCR triplex a tiempo real con sondas para la identificación de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae*. Curva de amplificación para cada gen/sonda y su respectivo número de ciclo (Ct). *N. meningitidis* (Gen: *SodC*; Sonda: FAM). *S. pneumoniae* (Gen: *LytA*; Sonda Cy5). *H. influenzae* (Gen: *Hpd*; Sonda HEX). Cycles: Número de ciclos. RFU: Unidades Relativas de Fluorescencia.

Se determinó un límite de detección de 1 copia de genoma por reacción para *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae*, observándose amplificación consistente en tres repeticiones por triplicado en la concentración más baja evaluada. Este resultado se obtuvo a partir de diluciones seriadas entre 1×10^6 y 1×10^0 copias de genoma/reacción (Figura 2, 1A, 2B y 3B).

El análisis de las curvas estándar del ensayo qPCR múltiplex mostró una alta correlación entre la concentración de ADN y los valores de Ct, con coeficientes de determinación (R^2) de 0,999 para *N. meningitidis*, 0,996 para *S. pneumoniae* y 0,998 para *H. influenzae* (Figura 2). Las eficiencias de amplificación obtenidas fueron de 100,2 % ($\pm 2,49$), 101,6 % ($\pm 1,00$) y 109,1 % ($\pm 0,85$); respectivamente, valores calculados como promedio de tres corridas independientes y dentro del rango óptimo para ensayos de qPCR en tiempo real (Figura 2, 1B, 2B y 3B).

En la detección de serogrupos de *N. meningitidis*, se estandarizaron tres reacciones de qPCR dúplex en tiempo real con SYBR Green, logrando la diferenciación específica de los serogrupos A, B, C, Y, W135 y X. El análisis de las curvas de disociación permitió distinguir claramente cada serogrupo, sin superposición de señales (Figura 3). Las concentraciones finales de los partidores y las condiciones de hibridación óptimas (60°C por 30 seg) se muestran en la Tabla Suplementaria 2. Para la estandarización de los genes *sacC*, *siaD*, *synE* y *xcbB*, se realizaron ajustes en las concentraciones de partidores (Tabla Suplementaria 1), obteniendo perfiles de temperatura *melting* (*T_m*) específicos para cada combinación dúplex.

Discusión

Este estudio estandarizó de manera óptima una qPCR tríplex para la detección de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae* utilizando los genes *sodC*, *lytA* y *hpd*; respectivamente. Además, se estandarizaron tres qPCR dúplex para la detección de los seis principales serogrupos de *N. meningitidis*. Otros estudios han desarrollado ensayos de qPCR múltiplex utilizando *ctrA*, *ply* y *bexA* como genes diana⁴. Sin embargo, se ha observado que distintas cepas de *Neisseria* sp. sufren reordenamiento capsular estando ausente el gen *ctrA*¹⁷; en el caso de *S. pneumoniae* se ha demostrado que *lytA* es más específico que *ply* para la detección de este patógeno¹⁸; y en el caso del gen *bexA*, este no está presente en *H. influenzae* no tipificable¹⁹. En este sentido, esta investigación se diferencia de lo reportado previamente¹⁹, al utilizar el gen *sodC* en lugar de *ctrA* para *N. meningitidis*, lo que permite detectar tanto cepas encapsuladas como no encapsuladas, mejorando la vigilancia en estudios de portadores. Además, para

H. influenzae, se emplea el gen *hpd*, asegurando la identificación de cepas tipificables y no tipificables, mientras que para *S. pneumoniae*, se mantiene el gen *lytA* por su alta especificidad.

Se evaluaron diferentes temperaturas de hibridación, resultando óptimo la amplificación para *sodC*, *lytA* y *hpd* a 62°C , durante 30 seg a 42 ciclos. Esto representa una diferencia con el estudio de Peletiri y cols.²⁰, con una ligera modificación en la temperatura de hibridación con 60°C durante 1 min por 45 ciclos. Asimismo, se evaluó la concentración de partidores y sondas con la finalidad de minimizar el consumo de reactivos; de esta manera se obtuvieron resultados favorables con las concentraciones descritas, sin mostrar inespecificidad en la amplificación. Comparativamente, los resultados de Mahamoudou y cols.¹⁵ y Vuong y cols.²¹ utilizaron concentraciones mayores, con resultados similares.

La cuantificación de ADN determinó un límite de detección de 1 copia de genoma/reacción para *sodC*, *lytA* y *hpd*, en contraste con lo reportado por Wang y cols.²², que mencionan que el rango de límite de detección en LCR en meningitis varía de 1 a 210 copias de genoma/reacción.

En otros estudios se ha realizado qPCR, single y múltiplex, con sondas para cada serogrupo (A, B, C, Y, W y X) de *N. meningitidis*^{20,22}. Como parte de la estandarización, se evaluó el uso de ensayos con SYBR Green para la detección de los serogrupos más frecuentes en la enfermedad meningocócica²³. Esta metodología permitió el desarrollo de una prueba a menor costo, en comparación con el uso de sondas. Estudios previos han reportado que la qPCR con SYBR Green puede ser una alternativa eficiente y económica sin comprometer la sensibilidad del ensayo, en comparación con FilmArray® panel meningitis²⁴⁻²⁶. En nuestro estudio, se logró la estandarización de tres dúplex: A/B, C/W y X/Y. Sin embargo, es importante considerar que el uso de SYBR Green puede presentar amplificaciones inespecíficas, debido a la interacción con muestras clínicas, lo que resalta la necesidad de un análisis riguroso de las curvas de disociación para una correcta interpretación de los resultados. Un aspecto relevante de este estudio es la reducción en el tiempo de diagnóstico. La qPCR permitió la detección de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae* en cuatro horas, aproximadamente⁴, en contraste con el cultivo, que pueden tardar 24 a 72 h^{27,28}. Esta reducción en el tiempo de respuesta es clave para la toma de decisiones clínicas y el inicio oportuno del tratamiento antibacteriano.

Entre las limitaciones de este estudio se encuentra la falta de simulación de la infección en muestras de LCR, ya que los fluidos corporales pueden tener inhibidores que afecten el rendimiento de la qPCR. Además, no se realizó la validación de los ensayos en este tipo de muestras, por lo que no se pudo determinar su sensibilidad y especificidad. Futuros estudios deberán evaluar ambas

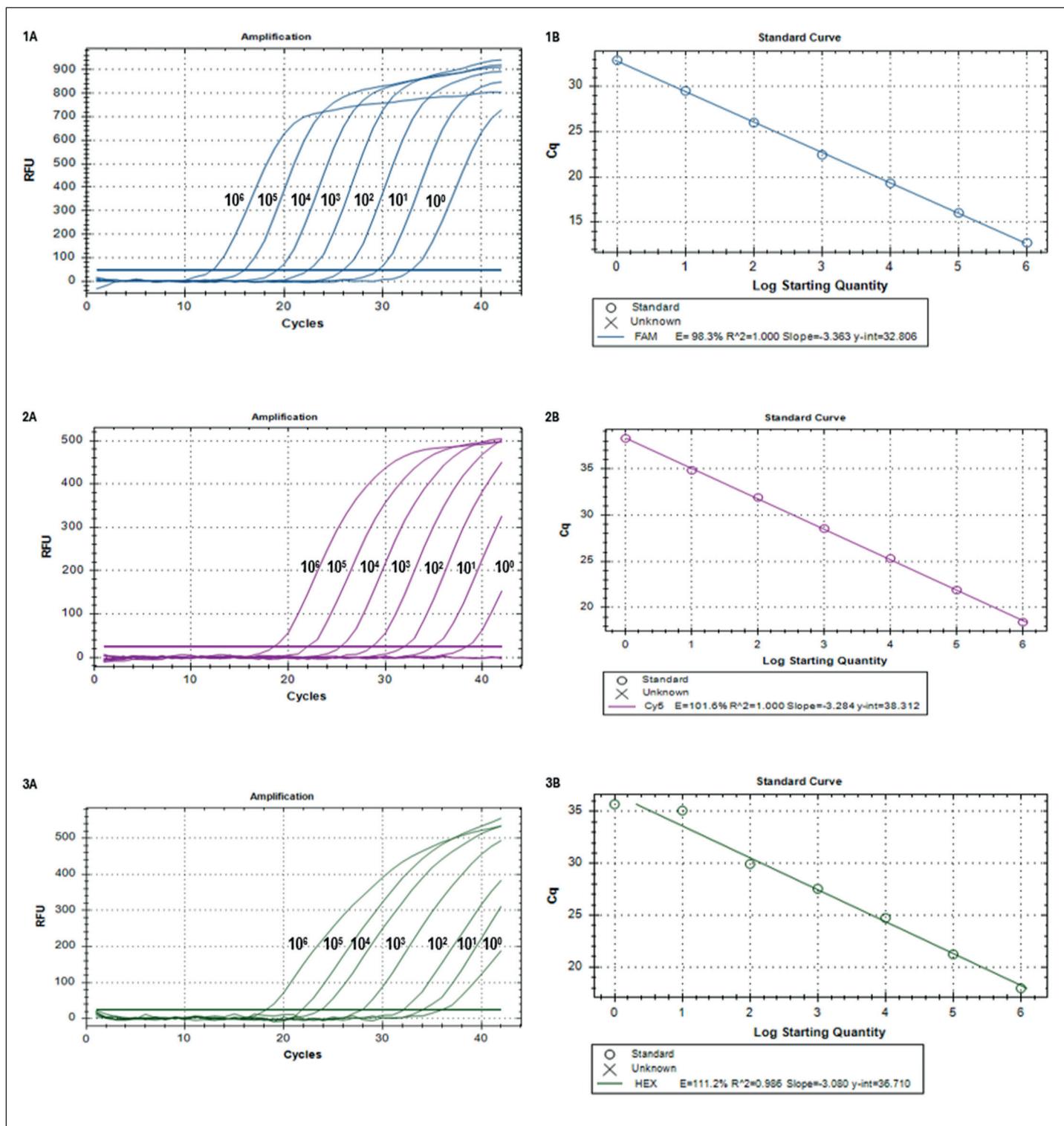


Figura 2. Límite de detección de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae* en qPCR con sondas. Para determinar el límite de detección se generaron diluciones seriadas dentro del rango de 1×10^6 hasta 1×10^0 copia de genoma/reacción, y con un límite de detección de 1 copia de genoma/reacción para cada bacteria. Las gráficas superiores (1A, *N. meningitidis*; 2A, *S. pneumoniae*; y 3A, *H. influenzae*) muestran las cinéticas de amplificación de cada una de las diluciones seriadas y los números de ciclos (Ct) correspondientes. Las gráficas inferiores muestran las regresiones lineales de las curvas estándares con una eficiencia (%) de 100,2% (1B), 101,6% (2B) y 109,1% (3B); respectivamente. Cycles: Número de ciclos. RFU: Unidades Relativas de Fluorescencia.

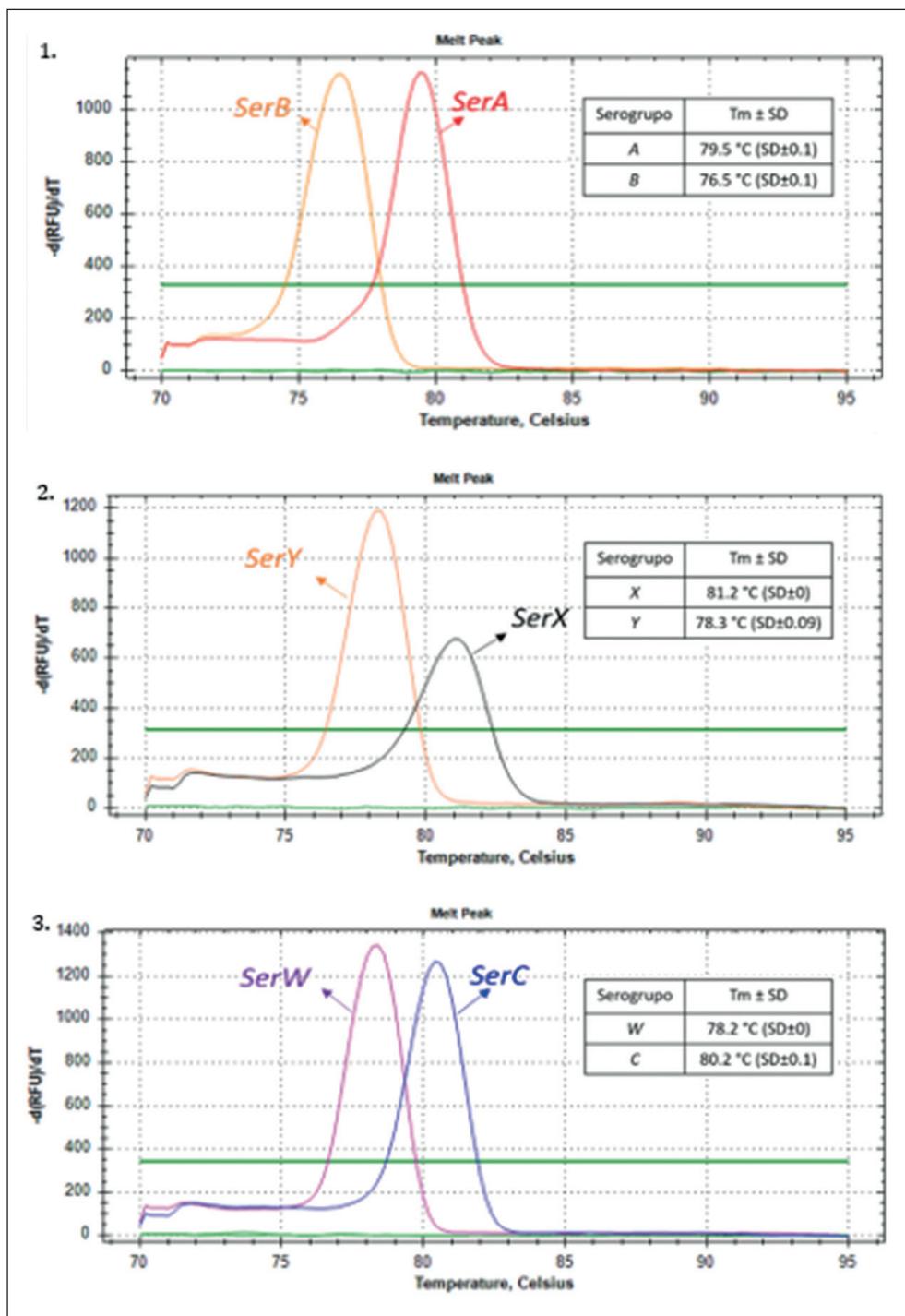


Figura 3. PCR dúplex a tiempo real con SYBR Green para la detección de los serogrupos A, B, C, W, X e Y de *N. meningitidis*. La gráfica muestra la temperatura de melting (o temperatura de fusión) de cada gen. (1). Dúplex para la detección de los serogrupos A y B de *N. meningitidis*. (2) Dúplex para la detección de los serogrupos X e Y de *N. meningitidis*. (3) Dúplex para la detección de los serogrupos C y W de *N. meningitidis*.

plataformas de qPCR en muestras de LCR provenientes de pacientes con sospecha de meningitis bacteriana, y comparar su rendimiento diagnóstico con el cultivo microbiológico.

En conclusión, se estandarizaron dos pruebas de qPCR

para el estudio etiológico de la meningitis bacteriana, lo que podría ayudar en nuestro medio al diagnóstico más preciso y oportuno, y ofrece una herramienta útil para la vigilancia epidemiológica para estudios e intervenciones en salud pública a nivel nacional y regional.

Referencias bibliográficas

1. Liesman RM, Strasburg AP, Heitman AK, Theel ES, Patel R, Binnicker MJ. Evaluation of a commercial multiplex molecular panel for diagnosis of infectious meningitis and encephalitis. *J Clin Microbiol* 2018; 56:10.1128/jcm.01927-17. <https://doi.org/10.1128/jcm.01927-17>
2. Harrison LH. Epidemiological profile of meningococcal disease in the United States. *Clin Infect Dis* 2010; 50 Suppl 2(S2): S37-44. doi: 10.1086/648963
3. Serrano-Heranz R, Sicilia-Urbán JJ, Sanz-Rojas P. [Pneumococcus infections. Classification. Predisposing factors. Pathogenic aspects of clinical or diagnostic relevance]. *Medicine (Madr)* 2010; 10: 3352-9. doi: 10.1016/S0304-5412(10)70042-1.
4. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarski EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1553-8. doi: 10.1128/JCM.39.4.1553-1558.2001.
5. Kaczmarski EB. Meningococcal disease in England and Wales: 1995. *Commun Dis Rep CDR Rev* 1997; 7: R55-59. PMID: 9127511
6. Dávalos L, Terrazas Y, Quintana A, Egoavil M, Sedano K, Castillo ME, et al. [Epidemiological, clinical and bacteriological characteristics of pneumococcal meningitis in pediatric patients from Lima, Peru]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2016; 33: 425-31. doi: 10.17843/rpmesp.2016.333.2349.
7. Tekin RT, Dinleyici EC, Ceyhan M, Karbuz A, Salman N, Sutcu M, et al. The prevalence, serogroup distribution and risk factors of meningococcal carriage in adolescents and young adults in Turkey. *Hum Vaccin Immunother* 2017; 13: 1182-9. doi: 10.1080/21645515.2016.1268304.
8. Purmohamad A, Abasi E, Azimi T, Hosseini S, Safari H, Nasiri MJ, et al. Global estimate of *Neisseria meningitidis* serogroups proportion in invasive meningococcal disease: A systematic review and meta-analysis. *Microb Pathog* 2019; 134: 103571. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103571.
9. Organización Panamericana de la Salud, Instituto Nacional de Salud de Colombia. Programa de Vigilancia de los Serotipos y Resistencia Antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. Manual de Procedimientos. Proyecto SIREVA II. 2004. <https://www3.paho.org/spanish/ad/ths/ev/labs-manual-vigilancia-serotipos.pdf>.
10. Gallagher SR, Desjardins PR. Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Curr Protoc Hum Genet* 2007; Appendix 3. doi: 10.1002/0471142905.hga03ds53.
11. Desjardins P, Conklin D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J Vis Exp* 2010; (45): 2565. doi: 10.3791/2565.
12. Mahboudi H, Heidari N, Rashidabadi ZI, Anbarestan AH, Karimi S, Darestani KD. Prospect and competence of quantitative methods via real-time PCR in a comparative manner: An experimental review of current methods. *Open Bioinforma J* 2018; 11: 1-11. doi: 10.2174/1875036201811010001.
13. Kralik P, Ricchi M. A basic guide to real-time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Front Microbiol* 2017; 8: 108. doi: 10.3389/fmicb.2017.00108.
14. Svec D, Tichopad A, Novosadova V, Pfaffl MW, Kubista M. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol Detect Quantif* 2015; 3: 9-16. doi: 10.1016/j.bdq.2015.01.005.
15. Ouattara M, Whaley MJ, Jenkins LT, Schwartz SB, Ouédraogo Traoré R, Diarra S, et al. Triplex real-time PCR assay for the detection of *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* directly from clinical specimens without extraction of DNA. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2019; 93: 188-90. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.10.008.
16. Mölling P, Jacobsson S, Bäckman A, Olcén P. Direct and rapid identification and genogrouping of meningococci and porA amplification by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4531-5. doi: 10.1128/JCM.40.12.4531-4535.2002.
17. Higa FT, Fukasawa LO, Gonçalves MG, Salgado MM, Lemos APS, Harrison LH, et al. Use of sodC versus ctrA for real-time polymerase chain reaction-based detection of *Neisseria meningitidis* in sterile body fluids. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013; 108: 246-7. doi: 10.1590/0074-0726108022013020.
18. Carvalho MDGS, Tondella ML, McCaustland K, Weidlich L, McGee L, Mayer LW, et al. Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2460-6. <https://doi.org/10.1128/jcm.02498-06>
19. Wang X, Theodore MJ, Mair R, Trujillo-Lopez E, du Plessis M, Wolter N, et al. Clinical validation of multiplex real-time PCR assays for detection of bacterial meningitis pathogens. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 702-8. doi: 10.1128/JCM.06087-11.
20. Peletiri IC, Ikeh EI, Ayanbimpe GM, Nna E. Molecular detection and characterization of bacteria from CSF samples of patients with suspected cerebrospinal meningitis in parts of northern Nigeria using metagenomic DNA extracts. *Afr J Clin Exp Microbiol* 2021; 22: 365-76. doi: 10.4314/ajcem.v22i3.8
21. Vuong J, Collard J-M, Whaley MJ, Bassira I, Seidou I, Diarra S, et al. Development of real-time PCR methods for the detection of bacterial meningitis pathogens without DNA extraction. *PLoS One* 2016; 11: e0147765. doi: 10.1371/journal.pone.0147765.
22. Wang X, Mair R, Hatcher C, Theodore MJ, Edmond K, Wu HM, et al. Detection of bacterial pathogens in Mongolia meningitis surveillance with a new real-time PCR assay to detect *Haemophilus influenzae*. *Int J Med Microbiol* 2011; 301: 303-9. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.11.004.
23. Mothershed EA, Sacchi CT, Whitney AM, Barnett GA, Ajello GW, Schmink S, et al. Use of real-time PCR to resolve slide agglutination discrepancies in serogroup identification of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 320-8. doi: 10.1128/JCM.42.1.320-328.2004.
24. López-Amor L, Escudero D, Fernández J, Martín-Iglesias L, Viña L, Fernández-Suárez J, et al. Meningitis/encephalitis diagnosis in ICU using multiplex PCR system: Is it time of change? *Rev Esp Quimioter* 2019; 32: 246-53. PMID: 30980520; PMCID: PMC6609945.
25. de Filippis I, de Andrade CF, Caldeira N, de Azevedo AC, de Almeida AE. Comparison of PCR-based methods for the simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in clinical samples. *Braz J Infect Dis* 2016; 20: 335-41. doi: 10.1016/j.bjid.2016.04.005.
26. Tao Y, Yue Y, Qiu G, Ji Z, Spillman M, Gai Z, et al. Comparison of analytical sensitivity and efficiency for SARS-CoV-2 primer sets by TaqMan-based and SYBR Green-based RT-qPCR. *Appl Microbiol Biotechnol* 2022; 106: 2207-18. doi: 10.1007/s00253-022-11822-4.
27. Poppert S, Essig A, Stoehr B, Steingruber A, Wirths B, Juretschko S, et al. Rapid diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3390-7. doi: 10.1128/JCM.43.7.3390-3397.2005.
28. Wu HM, Cordeiro SM, Harcourt BH, Carvalho M, Azevedo J, Oliveira TQ, et al. Accuracy of real-time PCR, Gram stain and culture for *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* meningitis diagnosis. *BMC Infect Dis* 2013; 13: 26. doi: 10.1186/1471-2334-13-26.