

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**Caracterização molecular de cepas de meningococo  
circulantes no Rio Grande do Sul e detecção de *Neisseria  
meningitidis* por PCR em tempo real**

**Luciana Weidlich**

**Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Zaha**

**Porto Alegre  
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**Caracterização molecular de cepas de meningococo  
circulantes no Rio Grande do Sul e detecção de *Neisseria  
meningitidis* por PCR em tempo real**

**Luciana Weidlich**

**Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Zaha**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação  
em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a  
obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica.

**Porto Alegre  
2008**

*À Ana Carolina, minha vida,  
e ao Juliano, meu amor.*

**"De absoluto só a Relatividade"**  
(Albert Einstein)

**" Se não houver frutos valeu a beleza das flores.  
Se não houver flores, valeu a sombra das folhas.  
Se não houver folhas valeu a intenção da semente. "**  
(Henfil)

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Arnaldo Zaha, meu orientador, pela confiança que sempre demonstrou em meu trabalho, mesmo não convivendo diariamente, e pelo exemplo de pesquisador que sempre foi, muito obrigada por tudo;

À Dra. Maria Lúcia Rossetti, que me mostrou que é possível aliar pesquisa e saúde pública, que assim influenciou na minha decisão de iniciar a pós-graduação, me apoiando durante todo o período do mestrado e doutorado;

Ao Dr. Leonard Mayer, meu supervisor durante o estágio de doutorando no exterior (CDC-Estados Unidos), a quem tenho enorme admiração pelo excelente profissional que é atuando científica e humanamente em benefício da saúde pública, por toda a assessoria, pelos inesquecíveis ensinamentos sobre saúde mundial e por ter me recebido com o carinho de um pai.

À Ludmila Baethgen, que me acolheu no grupo das meningites, que guiou o início da minha vida de pesquisadora, que se tornou minha amiga e maior companheira de trabalho, pelo incentivo constante, pela amizade verdadeira que construímos, pelos sonhos e planos conjuntos e pela participação fundamental neste trabalho;

À Cecília Klein, Luciana Nunes e Camile Moraes, também componentes do grupo das meningites, que tiveram papel importantíssimo na realização de várias etapas deste trabalho, sempre disponíveis, pelo companheirismo profissional e amigo e pela convivência agradável;

A todas as outras colegas de laboratório, pela troca de experiências e conhecimentos e pela convivência;

À Sílvia Rios e à Seção de Bacteriologia do LACEN, pela contribuição com isolados bacterianos e amostras clínicas e pela assessoria técnica;

Ao Albert Ko, pelas sugestões de direcionamento no início do meu doutorado;

À Claudete Kmetzsch, médica sanitária que acredita sempre em nossos trabalhos e contribui para a interação entre laboratório e dados epidemiológicos do RS;

À FEPPS, em especial ao CDCT, que me acolheu e acolhe diversos estudantes de pós-graduação, com o objetivo comum de produzir conhecimento voltado à saúde pública;

Ao Centers for Disease Control and Prevention, pela oportunidade de realização do estágio e de conhecer a parte técnica do maior centro de referência mundial em doenças infecciosas, e por financiar grande parte dos experimentos realizados neste trabalho;

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado no Brasil, e à CAPES pela bolsa de estágio de doutorando no exterior (PDEE), oportunidade única e fundamental na minha formação;

Aos meus familiares, pelo apoio constante, em especial aos meus pais, sempre companheiros, que me mostraram que o limite dos sonhos e dos planos é a gente quem determina, e que basta querer para poder, a quem tenho profunda admiração e reconhecimento pelos exemplos infinitos na minha vida;

Ao Juliano, pelo incentivo constante, por acreditar sempre, pelo amor que dedica à nossa família, e pelo “transporte internacional” de isolados e amostras clínicas.

# SUMÁRIO

<b>PARTE I.....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>5</b>
<i>I. NEISSERIA MENINGITIDIS.....</i>	<i>5</i>
1.1 BIOLOGIA E MICROBIOLOGIA.....	5
1.2 DOENÇA MENINGOCÓCICA .....	8
1.3 DIAGNÓSTICO .....	9
1.4 CARACTERIZAÇÃO DE <i>N. MENINGITIDIS</i> .....	14
1.5 VACINAS .....	16
1.6 EPIDEMIOLOGIA ATUAL DA DM NO MUNDO.....	20
1.7 EPIDEMIOLOGIA DA DM NO BRASIL E NO RIO GRANDE DO SUL.....	21
<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>24</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
OBJETIVO GERAL .....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>PARTE II.....</b>	<b>26</b>
<b>Capítulo 1: High prevalence of <i>Neisseria meningitidis</i> hypervirulent lineages and emergence of W135:P1.5,2:ST-11 clone in southern Brazil.....</b>	<b>27</b>
<b>Capítulo 2: Real-time PCR for rapid detection of meningococcal DNA in clinical specimens....</b>	<b>48</b>
<b>PARTE III.....</b>	<b>58</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>66</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>79</b>

# PARTE I



## RESUMO

*Neisseria meningitidis* é o agente mais prevalente entre os casos de meningite bacteriana, acompanhados de altas taxas de letalidade, causando também outras doenças invasivas. Os objetivos deste estudo foram: caracterizar as cepas de *N. meningitidis* de pacientes com doença meningocócica no Rio Grande do Sul (RS), de 2003 a 2005, assim como determinar a diversidade de tipos de PorA e avaliar uma técnica de PCR em tempo real para detectar o DNA de *N. meningitidis* em amostras clínicas. Alguns isolados e amostras clínicas foram caracterizados por MLST e tipagem de PorA, e amostras clínicas foram amplificadas por uma técnica de PCR em tempo real utilizando como alvo o gene *bexA*. Este estudo demonstrou alta prevalência de algumas linhagens hipervirulentas e emergência de algumas delas, incluindo as linhagens W135:P1.5,2:complexo ST-11, e C:P1.22,14-6:complexo ST-103. Estas linhagens são provavelmente responsáveis pelos aumentos de incidência dos sorogrupos W135 e C observados no período. Os complexos clonais mais prevalentes foram os complexos ST-32, ST-103, ST-11, ST-41/44. Os tipos de PorA mais encontrados para o sorogrupo B foram P1.19,15, P1.7,16, e P1.18-1,3, representando uma distribuição de tipos de PorA diferente de outros estados do Brasil, o que tem implicações na escolha e na eficácia de vacinas baseadas em OMPs. A caracterização detalhada e precisa das cepas de meningococo é um elemento importante nos estudos da epidemiologia, biologia populacional e evolução do meningococo, e fornece informações para o desenvolvimento de estratégias de controle da doença. Os resultados de sensibilidade (96%) e especificidade (97%) alcançados pela PCR para *N. meningitidis*, testando 186 amostras clínicas, foram adequadas para a sua utilização como método de confirmação de casos de meningite por meningococo, excluindo a etapa de extração de DNA das amostras clínicas, o que diminui o custo da reação.

## ABSTRACT

*Neisseria meningitidis* is the most prevalent agent among bacterial meningitis cases, with high fatality rates and also causing other invasive diseases. The aims of this study were: to characterize *N. meningitidis* strains causing invasive disease in Rio Grande do Sul (RS), during 2003 to 2005, as well as to determine the diversity of PorA VR types; and to evaluate a real time PCR assay to detect *N. meningitidis* DNA in clinical specimens. To achieve that, isolates and clinical specimens were characterized by MLST and PorA VR typing, and clinical specimens were amplified by real time PCR using target sequence from gene *bexA*. This study demonstrated high prevalence of some hypervirulent lineages and emergence of new ones, including the lineages W135:P1.5,2:ST-11 complex, and C: P1.22,14-6:ST-103 complex. These lineages are probably responsible for the increasing incidence of serogroups C and W135 observed. The most prevalent clonal complexes were ST-32, ST-103, ST-11 e ST-41/44 complexes. The most prevalent PorA VR types found for serogroup B were P1.19,15, P1.7,16, and P1.18-1,3, representing a different distribution of PorA types if compared to other states of Brazil. The different distribution of PorA VR types in RS has implications in vaccine design and efficacy. Detailed and accurate meningococcal characterization is an important element in studies of meningococcal epidemiology, population biology, and evolution and provides information for the design of control strategies. Good sensitivity (96%) and specificity (97%) were achieved for *N. meningitidis* PCR, testing 186 specimens. The method is appropriate to be used for confirmation of cases of meningococcal meningitis, and eliminating the DNA purification step reduces reaction costs.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**CIE**, contraímunoeletroforese

**Ct**, *cycle threshold*, ciclo inicial de amplificação

**DNA**, *desoxiribonucleic acid*, ácido desoxiribonucléico

**DM**, doença meningocócica

**ET**, *electrophoretic type* (tipo eletroforético)

**GNA**, *genome-derived Neisseria antigens*, antígenos derivados do genoma de *Neisseria*.

**LA**, aglutinação em látex

**LCE**, líquido cérebro-espinhal

**LOS**, lipooligossacarídeo

**MLEE**, *multilocus enzyme electrophoresis* (eletroforese enzimática multilocus)

**MLST**, *multilocus sequence typing* (tipagem por seqüência multilocus)

**NSST**, não sorosubtipável

**OMP**, *outer membrane protein* (proteína de membrana externa)

**OMV**, *outer membrane vesicles* (vesículas de membrana externa)

**PCR**, reação em cadeia da polimerase

**PFGE**, *pulsed field gel electrophoresis* (eletroforese em gel em campo pulsado)

**RNA**, *ribonucleic acid*, ácido ribonucléico

**rRNA**, RNA ribossomal

**RS**, Rio Grande do Sul

**SG**, sorogrupo

**SNC**, sistema nervoso central

**ST**, *sequence type* (tipo de seqüência)

**VR**, *variable region* (região variável)

**WHO**, *World Health Organization*, Organização Mundial de Saúde

# INTRODUÇÃO

As doenças invasivas causadas por *Neisseria meningitidis* apresentam evolução aguda e são geralmente acompanhadas de altas taxas de letalidade. A meningite bacteriana, uma das principais apresentações de doença invasiva, é considerada a mais importante causa de infecção do Sistema Nervoso Central (SNC). Pode ser causada por diversos vírus, fungos, bactérias e protozoários, sendo que a forma aguda da doença é provocada, na grande maioria dos casos, por uma destas três bactérias: *N. meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (Tunkel & Scheld, 1995; Mantese *et al.*, 2002). A incidência de meningite por *H. influenzae* diminuiu drasticamente nos países que instituíram a vacinação. Desde o seu descobrimento, em 1805, até meados do século 20, a meningite bacteriana foi sempre fatal. Apesar de a introdução da terapia antimicrobiana tornar a meningite bacteriana e as outras formas de doença bacteriana invasiva curáveis, a morbidade e a mortalidade observadas em casos de doença por meningococo continuam muito elevadas ainda hoje.

## ***1. Neisseria meningitidis***

### **1.1 Biologia e microbiologia**

*Neisseria meningitidis*, ou meningococo, é uma bactéria pertencente à família *Neisseriaceae* da classe  $\beta$ -proteobacteria. Apresenta-se como cocos gram-negativos, ocorrendo ao pares, aeróbicos, não móveis, não formadores de esporos, cuja temperatura ideal para cultivo é de 35 a 37 °C, na presença de CO<sub>2</sub> e umidade, são oxidase e catalase-positivos. O único reservatório natural do meningococo é o homem, sendo seu habitat a nasofaringe humana, geralmente sem causar infecção (Janda & Knapp, 2003).

O meningococo possui uma membrana interna e uma membrana externa, separadas por uma parede celular de peptideoglicano. A membrana externa contém numerosas estruturas protéicas, *pili* e lipooligossacarídeos (LOS), e é circundada por uma cápsula polissacarídica, nas cepas patogênicas, como pode ser visualizado na Figura 1.

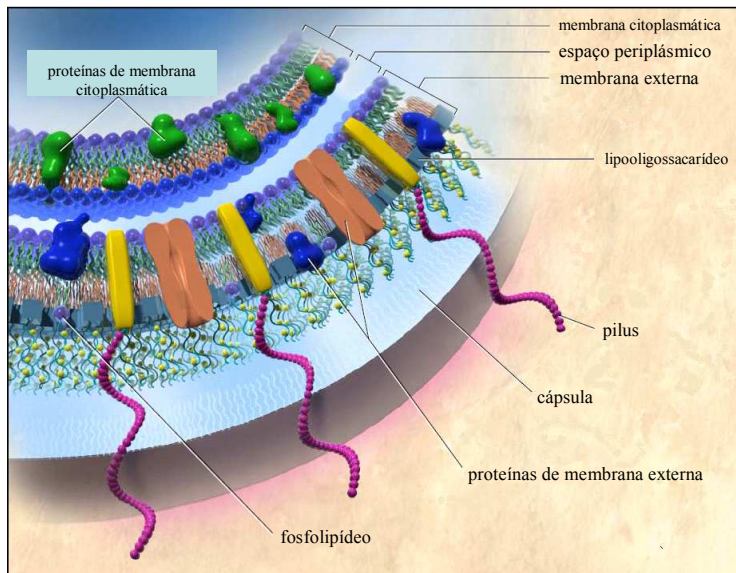


Figura 1. Corte transversal da membrana celular do meningococo (modificado de Rosenstein *et al.*, 2001)

A cápsula polissacarídica, essencial para a patogenicidade da bactéria, contém lipoproteínas e outros antígenos de superfície altamente variáveis (Vogel *et al.*, 1999, Perrett & Pollard, 2005). A cápsula polissacarídica pode ser um homopolímero ou um heteropolímero com repetições de mono, di ou trisacarídeos, possuindo funções importantes na transmissão da bactéria, colonização da mucosa da nasofaringe e na proteção contra dessecação, fagocitose e atividade bactericida mediada pelo complemento (Tabela 1). Entre os 13 sorogrupos conhecidos de meningococo, baseados em diferenças na estrutura de cápsula polissacarídica, seis são descritos como causadores de doença invasiva: A, B, C, W135, X e Y, sendo responsáveis pelos surtos, epidemias e endemias observados em todo o mundo. A expressão da cápsula

polissacarídica varia *in vivo*, sendo que as cepas patogênicas apresentam maior expressão de cápsula que as não patogênicas (Stephens *et al.*, 2007; Schoen *et al.*, 2008).

Tabela 1. Composição química da cápsula polissacarídica dos sorogrupos patogênicos de *Neisseria meningitidis*

SOROGRUPO	CÁPSULA POLISSACARÍDICA
A	$\alpha$ -N-acetil D-manosamina -1-fosfato
B	$\alpha$ -2,8-ácido N-acetilneuramínico
C	$\alpha$ -2,9-ácido N-acetilneuramínico
W <sub>135</sub>	D-galactose e ácido N-acetilneuramínico 1:1
Y	D-glicose e ácido N-acetilneuramínico 1:1

Adaptado de: Volk *et al.*, 1996; Tzeng & Stephens, 2000; Taha, 2002.

A membrana externa contém um número limitado de proteínas principais, chamadas proteínas de membrana externa ou “outer membrane proteins” (OMPs), classificadas em cinco classes estruturais, de acordo com o peso molecular e mapeamento de peptídeos (Tsai *et al.*, 1981). As OMPs de classes 1, 2 e 3 são porinas, possuindo função de passagem de pequenos solutos. Virtualmente todos os isolados de *N. meningitidis* contêm OMPs de classe 1, nomeadas proteínas PorA por serem codificadas pelo gene *porA*. As proteínas de classes 2 e 3 são codificadas pelo mesmo gene *porB*, e são chamadas de proteínas PorB. Foram identificadas três regiões hipervariáveis (VR-“variable regions”) em PorA, nas voltas 1, 4 e 5 (VR1, VR2 e VR3, respectivamente) e duas VRs nas voltas 1 e 5 de PorB. As VRs são localizadas nas porções superficiais das voltas contidas na estrutura, demonstrando alta variabilidade em tamanho e seqüência (van der Ley *et al.*, 1991). Por ser expressa pela maioria das cepas de meningococo e por sua capacidade antigênica, PorA constitui-se em potencial componente de vacinas, embora a grande variabilidade apresentada seja um fator limitante (Maiden *et al.*, 1991).

As OMPs de classe 4 (RmpM) têm função de ligação da membrana externa com peptídeo-glicano e interação com porinas (Grizot & Buchanan, 2004). As OMPs de classe 5 (Opc e Opa) são proteínas opacidade-associadas, que promovem aderência às células do hospedeiro (Rosenstein *et al.*, 2001).

FetA também é uma proteína presente na membrana externa, cuja expressão é regulada pela disponibilidade de ferro, e apresenta uma VR (Thompson, 2003). Outros componentes importantes da membrana externa são os lipooligosacarídeos (LOS), responsáveis pela indução de resposta inflamatória na doença invasiva (Plant, 2006) e os *pili*, que promovem aderência às células epiteliais, endoteliais e eritrócitos (Rosenstein *et al.*, 2001)

## 1.2 Doença meningocócica

Cerca de 10% das pessoas possuem *N. meningitidis* colonizando sua nasofaringe, habitat natural desta bactéria, convivendo com seu hospedeiro sem causar doença invasiva. A transmissão ocorre através de contato direto entre pessoas ou contato com secreções nasofaríngeas. O que provavelmente determina a invasão das células da nasofaringe do hospedeiro é uma combinação de fatores, como virulência da bactéria e fatores imunológicos e de interação com o hospedeiro (Stephens, 1999; Schoen *et al.*, 2007).

*N. meningitidis* entra na nasofaringe e adere-se às células epiteliais não ciliadas, através da ligação dos *pili* e proteínas Opa e Opc a receptores celulares. As bactérias aderidas podem ser engolfadas pela célula, entrar nos vacúolos fagocíticos e então passar através da célula, atingindo a corrente circulatória e causando doença invasiva. Neste processo, proteínas PorB aceleram o processo de maturação dos fagossomos. Na corrente circulatória, as bactérias secretam endotoxinas na forma de vesículas (“outer membrane vesicles” - OMV), contendo LOS, OMPs, fosfolipídeos e polissacarídeo capsular. Estas endotoxinas estimulam a produção de citocinas

pelos hospedeiros e ativam a via do complemento (Rosenstein *et al.*, 2001; van Deuren *et al.*, 2000; Tzeng & Stephens, 2000).

Por ser muitas vezes passageira, a entrada do meningococo na corrente circulatória nem sempre é reconhecida clinicamente. O meningococo sobrevive e multiplica-se apenas se for capaz de vencer os sistemas imunológicos humorais e fagocíticos. A presença da bactéria na circulação (bacteremia ou meningococemia) pode ser a fonte de infecção das meninges, pericárdio e articulações. Nas crianças com DM, 30 a 50% têm apenas meningite, 7 a 10% apresentam apenas sinais de sepse e 40% apresentam sinais de meningite e sepse ao mesmo tempo. Coagulação intravascular disseminada acompanha muitos casos de DM (Havens *et al.*, 1989; Kirsch *et al.*, 1996). A evolução da doença é aguda mas bastante variável, dependendo das defesas do hospedeiro, virulência da bactéria e quantidade de bactérias infectando o hospedeiro, ou seja, a evolução dos sintomas e da patogenia pode variar de poucas horas (nos casos de DM fulminante) até 48h, por exemplo.

No entanto, para a maioria das pessoas a colonização da nasofaringe pelo meningococo é um processo imunogênico e os anticorpos bactericidas circulantes no sangue parecem impedir a multiplicação e disseminação da bactéria para outros tecidos. Isso explicaria o fato dos picos de incidência de infecções invasivas de meningococo ocorrerem entre 6 meses e 2 anos de idade, que corresponde ao tempo de perda dos anticorpos transplacentários e à aquisição dos anticorpos naturalmente adquiridos (Arditi & Yogev, 1997).

### **1.3 Diagnóstico**

O diagnóstico clínico da doença meningocócica inclui o reconhecimento de sinais e sintomas como febre, “rash” cutâneo, meningismo, estado neurológico alterado e petéquias. Entretanto, o diagnóstico deve ser confirmado através de métodos laboratoriais, pois estes



sintomas são comuns a meningites por outros agentes e o desenvolvimento dos sinais mais específicos, como meningismo e petéquias, acontece geralmente após 8 h de infecção, ou estão ausentes. O líquido cérebro-espinhal (LCE) coletado através de punção lombar deve ser examinado através de análise citológica, bioquímica e bacteriológica (CDC, 1998).

### **Análise citoquímica**

Alterações como aumento do número de leucócitos polimorfonucleares, baixa glicorraquia e altos níveis de proteínas no LCE são indicativos de meningite bacteriana, como indicado na Tabela 2 (Faria & Farhat, 1999).

Tabela 2. Características do LCE em meningites bacterianas

<b>LCE</b>	<b>Meningite Bacteriana</b>
Nº de Leucócitos	↑ (em geral >1000/mm <sup>3</sup> ) predomínio de neutrófilos
Glicose	↓ (< 40mg/dL)
Relação glicose LCE/sangue	< 0,3
Proteínas	↑ (em geral >100 mg/dL)
Gram (Bacterioscopia)	Bactéria presente nos casos não tratados
Cultura	Positiva

Fonte: modificado de Faria & Farhat, 1999.

### **Análise bacteriológica**

O diagnóstico presuntivo rápido pode ser feito através da observação do LCE pela coloração de Gram, onde são visualizados diplococos gram-negativos intra ou extracelulares, de tamanho variável (Janda & Knapp, 2003). Esse método, quando realizado por profissionais treinados, alcança sensibilidade entre 50 e 80% (Gray & Fedorko, 1992; Dunbar *et al.*, 1998; Phillips & Simor, 1998).

A cultura é considerada o método de referência para a identificação do meningococo. Amostras de sítios normalmente estéreis (LCE) podem ser inoculadas em meio ágar chocolate ou ágar sangue, já as amostra de sítios não estéreis (“swabs” de nasofaringe) devem ser semeadas em meio seletivo também. A incubação ocorre entre 35 e 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, e deve ser observada depois de 24h, 48h e 72h. As colônias têm aproximadamente 1 mm de diâmetro em 24h de incubação, são convexas, lisas e de superfície brilhante; em ágar sangue podem apresentar coloração acinzentada. As cepas com alta expressão da cápsula podem ser mucóides (Janda & Knapp, 2003). Sensibilidades em torno de 85% foram relatadas para a cultura a partir de amostras de pacientes não tratados (Tunkel & Sheld, 1995; Phillips & Simor, 1998). Tanto a cultura quanto a coloração de Gram têm a sensibilidade diminuída em mais de 50% quando realizadas a partir de amostras clínicas de pacientes tratados previamente à coleta da amostra (Tunkel & Sheld, 1995).

O teste de aglutinação em látex (LA) é uma técnica rápida e de fácil execução, fazendo dele uma técnica alternativa apropriada para o diagnóstico de meningite meningocócica. A sensibilidade do LA é aproximadamente 70 a 80%, comparado à cultura. Os resultados falso-positivos são a maior limitação desta técnica, além de não serem apropriados para a detecção de todos os sorogrupos (Requejo & Ferreira, 1993; Alkmin *et al.*, 1995; Ende *et al.*, 1995; Perkins *et al.*, 1995). A contraimunoeletroforese (CIE) é uma técnica menos sensível, mais laboriosa e dispendiosa, se comparada ao LA, além de ter um tempo longo de execução (Alkmin *et al.*, 1996; Barroso, 2000).

### **Análise por métodos moleculares**

Atualmente, várias metodologias baseadas na detecção do DNA de patógenos em materiais biológicos e isolados de cultura têm sido desenvolvidas e amplamente utilizadas (Mothershed *et al.*, 2006). Um marco tecnológico ocorreu em 1983 com o desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Saiki *et al.*, 1985). A PCR, que baseia-se na amplificação

*in vitro* de fragmentos de DNA utilizando “primers” específicos, foi um dos grandes avanços para possibilitar a rápida detecção de bactérias em amostras clínicas, e tem sido utilizada, associada ou não, à outra metodologia como hibridização ou digestão dos produtos amplificados com enzimas de restrição.

As metodologias baseadas em PCR têm demonstrado algumas vantagens úteis ao diagnóstico: rapidez, boa sensibilidade, não dependência da viabilidade do microrganismo para detecção, como no caso do uso prévio de antimicrobianos, além de detectar quantidades muito pequenas de DNA presentes na amostra clínica (Rossetti *et al.*, 1997; Guiver *et al.*, 2000; Baethgen *et al.*, 2003).

A partir da primeira utilização da PCR como método diagnóstico de meningite meningocócica por Kristiansen *et al.* (1991), diversos autores sugerem a utilização desta metodologia para auxiliar no diagnóstico de pacientes com suspeita da doença e na epidemiologia das meningites bacterianas. Desde então, diferentes alvos de amplificação e diferentes estratégias de detecção de produtos amplificados têm sido descritas (Greisen *et al.*, 1994; Radström *et al.*, 1994; Bäckman *et al.*, 1999; Balganeshe *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2000; de Filippis *et al.*, 2005).

A PCR em tempo real, descrita por vários autores para a detecção do DNA bacteriano em casos de meningite causada por *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*, parece ter dado início a uma nova era no diagnóstico de meningite bacteriana (Guiver *et al.*, 2000; Corless *et al.*, em 2001; Mothershed *et al.*, 2004). Este método combina a química da PCR e a tecnologia de detecção de produtos amplificados por sondas fluorescentes no mesmo tubo de reação, realizadas no mesmo equipamento. Uma das tecnologias utilizadas para a PCR em tempo real, chamada “Taqman”, baseia-se no uso de uma sonda, dirigida contra uma região interna da seqüência que será amplificada, e que possui um fluoróforo numa das extremidades e um “quencher” na outra. Durante a amplificação, à medida que a enzima Taq polimerase avança sintetizando uma fita

nova de DNA, ela vai degradando a sonda à sua frente, liberando o fluoróforo, permitindo que ocorra a absorção de energia e emissão de luz. A energia para a excitação dos fluorocromos provém de um feixe de “laser” que atravessa a amostra. A medição da radiação é feita pelo detector do equipamento que traça um gráfico com a absorção obtida, após cada ciclo de PCR. O ciclo em que o limite de negatividade é ultrapassado está diretamente relacionado à quantidade de DNA existente no início da reação. (Espy *et al.*, 2006; Mothershed *et al.*, 2006).

A preparação da amostra clínica para a reação é muito importante, pois interfere diretamente na sensibilidade do teste. Diferentes protocolos têm sido utilizados para a extração do DNA bacteriano a partir da amostra clínica. (Kristiansen *et al.*, 1991; Ni *et al.*, 1992; Ley *et al.*, 1997; Bäckman *et al.*, 1999).

Raskin *et al.* (1992) propuseram a utilização da amostra clínica sem extração de DNA. A amostra foi submetida a três ciclos de 96°C por 3 minutos e 55°C por 3 minutos, a fim de romper as células presentes e liberar o DNA, e então foi adicionada à mistura da PCR. Este método foi testado por Baethgen *et al.* (2003) e comparado a um método comercial de extração de DNA (Sephaglas–Band Prep Kit Pharmacia), sendo que a sensibilidade do teste foi maior quando não houve extração de DNA.

A PCR pode ser utilizada também para a determinação do sorogrupo de *N. meningitidis*, através de “primers” específicos que identificam seqüências de cada um dos diferentes tipos de cápsula polissacarídica da bactéria (Taha *et al.*, 2000a). Além disso, várias metodologias utilizadas para a caracterização do meningococo, como “multilocus sequence typing” (MLST) e tipagem de PorA utilizam a PCR para amplificação do material genético e posterior seqüenciamento de DNA.

## 1.4 Caracterização de *N. meningitidis*

### Métodos fenotípicos

A caracterização sorológica do meningococo utiliza um painel de anticorpos monoclonais baseados nas propriedades antigênicas de diferentes componentes da estrutura bacteriana, seguindo esta classificação: a cápsula polissacarídica determina o sorogrupo, a proteína PorB determina o sorotipo, o sorosubtipo é determinado pela proteína PorA e o imunotipo é determinado pela composição de LOS (Frasch, 1985; Russel *et al.*, 2004).

Estes métodos ainda são bastante utilizados, mas possuem algumas limitações que devem ser consideradas: o painel de anticorpos é limitado, alguns isolados não expressam o alvo da tipagem, e existe pouca correlação com a relação genética entre os isolados, devido aos altos níveis de pressão seletiva aos quais estes componentes são expostos (Caugant, 1998).

### Métodos genotípicos

A fim de fornecer métodos de tipagem alternativos aos fenotípicos, de estabelecer a real relação epidemiológica entre as cepas de *N. meningitidis* circulantes e de aumentar a informação sobre a dinâmica da DM, vários métodos genotípicos (análise baseada no DNA bacteriano) têm sido desenvolvidos e utilizados nos últimos anos.

O “pulsed-field gel electrophoresis” (PFGE) é um método muito utilizado para a determinação da relação genética entre cepas epidemiologicamente relacionadas, por proporcionar uma análise de todo o cromossomo bacteriano (Bygraves & Maiden, 1992; Popovic *et al.*, 2001; McEllistrem *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2006). No entanto, a comparação interlaboratorial dos resultados do PFGE com os de outros métodos não é satisfatória, além do método não ser eficiente na identificação de linhagens hipervirulentas de meningococo.

Para a vigilância mundial da DM, é adequado avaliar a variação em diferentes *loci* do genoma, cujas taxas de recombinação não sejam tão altas quanto às de genes expostos à pressão

seletiva. Alguns genes constitutivos (“housekeeping genes”), que codificam proteínas que fazem parte do metabolismo central da bactéria, e por isso estão sob pressão seletiva estável para conservação de suas funções metabólicas, são alvos ideais para sistemas de vigilância abrangentes (Urwin & Maiden, 2003).

“Multilocus enzyme electrophoresis” (MLEE) tem uma abordagem *multilocus*, analisando a variação em enzimas metabólicas através da mobilidade eletroforética dessas proteínas (Selander *et al.*, 1986). Foi um método fundamental para a determinação de complexos clonais entre as populações de *N. meningitidis* e para a identificação de algumas linhagens hipervirulentas (linhagens com alta associação à doença invasiva), classificadas quanto ao tipo eletroforético (ET). No entanto, o MLEE é uma técnica laboriosa e cujos resultados não são completamente comparáveis interlaboratorialmente.

O “multilocus sequence typing” (MLST) foi desenvolvido sobre os mesmos princípios do MLEE, agregando o uso da análise de seqüências de nucleotídeos e organização de um banco de dados de acesso público pela internet. O MLST identifica variações nas seqüências de nucleotídeos de fragmentos internos de 7 genes constitutivos e o perfil de alelos identifica um ST (“sequence type”). Um grupo de STs que tem quatro ou mais alelos em comum é definido como um complexo clonal, ou seja, tem um genótipo ancestral em comum (Maiden *et al.*, 1998). Este método é de fácil reprodutibilidade interlaboratorial e os resultados estão disponíveis via internet (<http://pubmlst.org.neisseria/>) para comparação mundial e estabelecimento de possíveis rotas de disseminação da DM.

A tipagem de PorA é a determinação da seqüência de nucleotídeos das regiões hipervariáveis-principalmente VR1 e VR2- do gene *porA* (Russell *et al.*, 2004). Existe certa analogia entre as regiões seqüenciadas a as regiões identificadas pelos anticorpos na sorosubtipagem. Cada seqüência é traduzida em um peptídeo, o qual é classificado em uma

família, indicada por um número, com sua possível variante identificada por outro número, separado por um hífen. Assim obtém-se a nomenclatura convencionada P1.VR1,VR2, por exemplo, P1.5-2,10-1 (Jolley *et al.*, 2007). A classificação é descrita e mantida em uma base de dados na internet (<http://neisseria.org/nm/typing>). (Russel *et al.*, 2004).

O seqüenciamento da única VR do gene *fetA* também é utilizado como marcador molecular na caracterização de *N. meningitidis*, sendo considerado também candidato possível na composição de vacinas de OMPs (Thompson *et al.*, 2003).

O seqüenciamento do gene *porB* é mais complexo, pois a variabilidade está dispersa pela seqüência do gene, sendo recomendada como informação complementar à PorA e FetA, somente quando maior nível de discriminação for necessário (Jolley *et al.*, 2007).

De acordo com Jolley *et al.* (2007), a tipagem molecular para vigilância epidemiológica da DM deve compreender os métodos de MLST, tipagem de PorA e tipagem de FetA, além da determinação do sorogrupo. Assim, a nomenclatura proposta abrangendo todos os resultados destes métodos para uma determinada cepa de meningococo seria: sorogrupo: tipo PorA (subtipo): tipo FetA: ST(complexo clonal), como por exemplo: B: P1.19,15: F5-1: ST-33 (cc32).

## **1.5 Vacinas**

O desenvolvimento de vacinas efetivas contra todos os sorogrupos de meningococo tem sido o objetivo de muitos grupos de pesquisa atualmente, pois representa a única possibilidade de prevenção da DM, que provoca altas taxas de mortalidade tanto em países menos desenvolvidos economicamente como em países mais desenvolvidos, ainda que a administração do tratamento seja precoce.

## **Vacinas contra os SGs A, C, Y e W135**

Vacinas contra antígenos da cápsula polissacarídica dos SGs A, C, Y e W135 foram introduzidas nas décadas de 1970 e 1980 (Gotschlich *et al.*, 1969; Artenstein *et al.*, 1970; Gold *et al.*, 1975). As vacinas polissacarídicas, em geral, são efetivas e seguras em adultos e crianças maiores de 2 anos. As vacinas contra os SGs A e C, principalmente, mostraram-se ineficazes para o grupo de crianças menores de 2 anos, por causa da ausência de resposta a antígenos T-independentes nesta idade. Além disso, não induzem memória imunológica, não influenciam na diminuição de portadores assintomáticos, não têm reação à dose de reforço e o período de proteção é limitado em 3 a 5 anos. Atualmente, não são utilizadas de rotina, sendo indicadas em casos de epidemias e surtos, por exemplo, para o controle de epidemias de DM nos países africanos do cinturão de meningite (Stephens, 2007).

Um grande avanço na prevenção da DM foi o desenvolvimento de vacinas conjugadas, unindo componentes da cápsula polissacarídica e proteínas (toxina diftérica mutante não tóxica-CRM197, ou toxóide tetânico), alterando a natureza da resposta ao polissacarídeo bacteriano para uma resposta T-dependente. Assim, quando as células B reconhecem o polissacarídeo, elas processam a proteína carreadora, apresentando seus epitopos às células T-CD4+. Este complexo antigênico induz a produção de altos níveis de anticorpos, mesmo em crianças menores de 2 anos, além de induzir a formação de linfócito B de memória, possuindo excelente efeito com dose de reforço. As vacinas conjugadas têm também a capacidade de diminuir o carregamento do meningococo na população, diminuindo assim a transmissão da doença (MacLennan *et al.*, 2000; Snape and Pollard, 2005, Sáfadi & Barros, 2006).

Várias vacinas conjugadas, mono ou bivalentes têm sido desenvolvidas por diversas empresas. Uma vacina tetravalente, contra os SGs A, C, Y e W135 foi licenciada nos Estados Unidos para uso em adolescentes e alguns grupos de risco (Bilukha & Rosenstein, 2005).



Atualmente, estão licenciadas no Brasil três vacinas conjugadas contra o SG C, duas nas quais o polissacarídeo capsular é conjugado à toxina diftérica mutante (MCC-CRM197) conhecidas internacionalmente como Meningitec® (Lab. Wyeth) e Menjugate® (Lab. Novartis), e outra na qual a conjugação é feita com o toxóide tetânico (MCC-TT), internacionalmente conhecida como Neisvac® (Lab. Baxter) (Sáfadi & Barros, 2006).

### **Vacinas contra o sorogrupo B**

A cápsula polissacarídica de *N. meningitidis* SG B é composta por um polímero de ácido  $\alpha$ -2,8 *N*-acetilneuramínico (ácido polisiálico), o qual também está presente em tecidos humanos, e por isso não induz resposta protetora. Conseqüentemente, as estratégias para o desenvolvimento de uma vacina contra o SG B têm sido direcionadas para a utilização de antígenos não capsulares, OMP e LOS, contidos nas OMVs. Os anticorpos produzidos em indivíduos vacinados com vacinas OMV são dirigidos principalmente contra os epitopos das proteínas PorA e Opa (Perret & Polard, 2005; Girard *et al.*, 2006).

A proteína PorA tem sido identificada como grande indutora de anticorpos bactericidas no soro, além de ser expressa por praticamente todos os meningococos. Algumas vacinas contendo PorA estão sendo desenvolvidas e avaliadas, revelando eficácias variáveis. Duas vacinas OMV foram desenvolvidas para uso em surtos ocorridos em Cuba e na Noruega, causados pelos fenótipos B:4:P1.19,15 e B:15:P1.7,16, respectivamente, entre 1987 e 1991, sendo utilizadas nos países de origem, no Brasil e no Chile. A eficácia e a segurança foram demonstradas em crianças entre 10 e 16 anos, para as duas vacinas. Estudos da vacina cubana nas campanhas de vacinação em massa em alguns estados do Brasil não demonstraram resposta imunológica em crianças menores de 4 anos. Além disso, estudos recentes no Brasil demonstraram altas prevalências do fenótipo B:15:P1.7,16, sugerindo curta duração do efeito protetor da vacina cubana. As vacinas baseadas em PorA não conferem proteção heteróloga, a proteção é específica para cada tipo de

PorA, o que dificulta sua utilização em populações cuja diversidade de tipos de PorA é alta. Assim, é importante considerar que o surto no Brasil não era clonal, e o surto em Cuba era 95% clonal (Bjune *et al.*, 1991; Sierra *et al.*, 1991; de Moraes *et al.*, 1992; Tappero *et al.*, 1999).

Uma vacina OMV contendo PorA, PorB e LOS da cepa epidêmica da Nova Zelândia (B:4:P1.7b,4) foi desenvolvida e está sendo utilizada e avaliada, demonstrando resposta sorológica em 75% das crianças entre 16 e 24 meses, em estudo de fase II (Wong *et al.*, 2007). O desenvolvimento de outra vacina, contendo OMV e LOS detoxificados, foi descrito no Brasil, em 2004. Esta vacina demonstrou proteção homóloga e heteróloga contra infecção meningocócica e choque séptico, em ratos (Jessouron *et al.*, 2004).

O seqüenciamento dos genomas das cepas de *N. meningitidis* SG B (MC58), SG A (Z2491) e SG C (FAM18) revelou novas proteínas como antígenos candidatos a componentes de vacinas (Parkhill *et al.*, 2000; Tettelin *et al.*, 2000; Bentley *et al.*, 2007). A partir da vacinologia reversa, seqüências de proteínas com possível potencial antigênico expostas na superfície da estrutura bacteriana foram identificadas, expressas em *Escherichia coli* e as proteínas purificadas foram utilizadas para imunizar camundongos. Algumas proteínas revelaram atividade bactericida no soro e foram chamadas GNAs (“genome-derived *Neisseria* antigens”) (Pizza *et al.*, 2000). O potencial antigênico das lipoproteínas GNA33, GNA2132, GNA1946 e GNA 1870 (LP2086) tem sido estudado, bem como sua presença em diferentes cepas de meningococo e diversidade em determinadas populações, demonstrando resultados promissores principalmente para GNA1870, que possui boa atividade imunogênica em camundongos, principalmente quando combinada à uma vacina OMV (Granoff *et al.*, 2001; Massignani *et al.*, 2003; Jacobsson *et al.*, 2006; Koeberling *et al.*, 2007; Plested *et al.*, 2008).

NadA, outro antígeno descoberto pela vacinologia reversa, bastante conservado nos SGs B e C, está envolvido na adesão e invasão às células hospedeiras e está presente na maioria dos

isolados pertencentes às linhagens hipervirulentas ET-37, ET-5 e “cluster” A4, mas não foi encontrado em outras linhagens estudadas (Comanducci *et al.*, 2002). Apresentou distribuição variável entre isolados dos sorosubtipos mais prevalentes no Brasil e está praticamente ausente em isolados de portadores saudáveis (Fukasawa *et al.*, 2003; Comanducci *et al.*, 2004).

## 1.6 Epidemiologia atual da DM no mundo

A incidência de DM nos diversos continentes e países varia de alguns raros casos a mais de 1.000 casos por 100.000 habitantes.

O meningococo SG A está ligado aos maiores índices de incidência de DM, causando grandes epidemias em países da África Subsaariana, região descrita como “meningitis belt” ou cinturão de meningite, que acontecem a cada 5-10 anos e surtos anuais durante a estação seca. Os surtos e epidemias no cinturão de meningite são considerados clonais, de emergência e disseminação rápidas, provocados por meningococos SG A pertencentes aos complexos clonais ST-5 e ST-7 (Greenwood *et al.*, 1985; Caugant & Nicolas, 2007; Stephens, 2007). Este sorogrupo também é um dos mais prevalentes em alguns países da Ásia (Zhang *et al.*, 2008). Desde 2001, surtos causados pelo SG W135 pertencentes ao complexo ST-11 têm ocorrido em alguns países africanos (Caugant & Nicolas, 2007). Vacinas contra o SG A são utilizadas apenas para controlar os surtos e epidemias, por causa da disponibilidade e alto custo de manter um programa contínuo de vacinação. Em razão disto, existe um projeto em desenvolvimento para a produção de uma vacina OMV efetiva contra o SG A, com larga escala de produção e baixo custo, para ser utilizada especialmente nesses países africanos (Jodar *et al.*, 2003).

O sorogrupo B é o maior causador de casos esporádicos e doença endêmica, além de estar envolvido em casos de surtos prolongados na Europa, Cuba, Chile, Estados Unidos, Brasil, causando altas taxas de morbidade e mortalidade (Tzeng & Stephens, 2000; Dyet & Martin,

2006; Brehony *et al.*, 2007). A incidência global de DM pelo SG B tem sido estimada entre 20.000 e 80.000 casos, ocorrendo 2.000 a 8.000 mortes por ano (Girard *et al.*, 2006). Os complexos clonais ST-32 e ST-41/44 compreendem a maior parte dos meningococos SG B na Europa, e em alguns países da América Latina (de Filippis & Vicente, 2005; Gray *et al.*, 2006; Brehony *et al.*, 2007). As epidemias causadas pelo SG B desenvolvem-se lentamente e podem prolongar-se por mais de 10 anos. Na década de 70, iniciou-se uma epidemia pela cepa de fenótipo B:15:P1.7,16, complexo ET-5, que perdurou por anos na Noruega (Caugant, 1998). Uma cepa B:P1.7-2,4 do complexo ST-41/44 é a responsável pela epidemia que ocorre na Nova Zelândia desde 1991 (Dyet & Martin, 2006).

O sorogrupo C, especialmente do complexo clonal ST-11/ET-37 é responsável por surtos epidêmicos (África, Brasil) e surtos localizados, principalmente em grupos de adolescentes, nos Estados Unidos, Canadá e oeste europeu (Stephens, 2007). Este sorogrupo também é determinante na manutenção de doença endêmica em alguns países (Harrison, 2006).

O SG W135 passou a ser considerado como potencial responsável por surtos e epidemias a partir do surto ocorrido em 2000, durante a peregrinação do Hajj, na Arábia Saudita, provocado pela cepa W135:P1.5,2:ST-11:ST-11cc. A partir de então, a presença de cepas geneticamente relacionadas tem sido descrita em vários países, em casos esporádicos e surtos (Taha *et al.*, 2000b; Aguilera *et al.*, 2002; Mayer *et al.*, 2002; Kilic *et al.*, 2006).

O número de casos causados pelo SG Y vem aumentando nos Estados Unidos e em Israel, e o SG X tem causado surtos localizados em partes da África subsaariana (Stephens *et al.*, 2007).

## **1.7 Epidemiologia da DM no Brasil e no Rio Grande do Sul**

Desde o primeiro relato de DM no Brasil, em 1916, vários surtos e epidemias já foram descritos (Barroso, 2000). As epidemias começaram a ser tratadas como assunto de interesse em

saúde pública na década de 1970, quando a pandemia devida a cepas da linhagem III atingiu o país, ao mesmo tempo que epidemias por cepas do SG C, complexo ET-37 desenvolviam-se no país em alguns estados (Olyhoek *et al.*, 1987; Barroso, 2000; Puricelli *et al.*, 2004; de Moraes & Barata, 2005). Em 1975 iniciou-se o Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica das Meningites (WHO, 1998; Barroso, 2000).

No final da década de 1980, desenvolveu-se no Brasil uma epidemia causada por cepas de fenótipo B:4:P1.19,15, atingindo principalmente a região da Grande São Paulo (Sacchi *et al.*, 1992; Caugant, 1998; Lemos, 2005). Então, muitos estados passaram a utilizar a vacina cubana específica para este SG e subtipo de meningococo (Caugant, 1998).

O aumento do número de casos a partir de 1990 foi atribuído ao fenótipo C:2b:P1.3, que foi responsável por 74% dos isolados do sorogrupo C de 1990 (Sacchi *et al.*, 1992) a meados de 1996 (Barroso *et al.*, 1996; Lemos, 2005). Neste mesmo período, este fenótipo foi responsável por surtos na cidade de Curitiba, e por casos de DM nos estados de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul (RS) (Sacchi *et al.*, 1995).

Em 1995, os SGs B e C apresentavam prevalências muito semelhantes na cidade de Porto Alegre, RS, enquanto que no ano de 1999 foi observado um grande aumento no número de casos notificados atribuídos ao sorogrupo B (Rigatti, 2000). Esta diminuição de casos do SG C provavelmente foi devida à campanha de vacinação para o sorogrupo C em 1995, e à campanha de vacinação com a vacina B/C de origem cubana, resultando no quase desaparecimento de casos atribuídos ao meningococo C na cidade.

Sacchi *et al.* (2001) demonstraram que os sorosubtipos mais prevalentes no Brasil entre 1997 e 1998 eram P1.19,15 (66%) e P1.7,1 (11%), para a maioria dos estados brasileiros. Nos estados da região Sul e principalmente no RS, no entanto, observou-se prevalência dos sorosubtipos P1.19,15 (14%) e P1.7,16 (41%), além da maior prevalência de isolados não

sorosubtipáveis (17%) do país. Outro estudo demonstrou que, até o ano de 2001, este panorama continuou praticamente constante, com maior disseminação do sorosubtipo P1.19,15 pelo país, e isolados do sorosubtipo P1.7,16 praticamente confinados à região Sul do Brasil (Lemos *et al.*, 2006).

Um estudo de caracterização de 84 isolados dos SGs B e C, provenientes dos estados do Rio de Janeiro, Santa Catarina, Bahia e Pernambuco, demonstrou que 82% dos isolados eram geneticamente relacionados a linhagens hipervirulentas. Os complexos clonais mais prevalentes foram ST-32/ET-5 (68%), ST-8/cluster A4 (6%), ST-41/44/linhagem 3 (5%) e ST-11/ET-37 (3%), e os subtipos mais prevalentes foram P1.19,15 (48%) e P1.7,1 (17%) (de Filippis & Vicente, 2005).

Lemos *et al.* (2007) relataram aumento do número de casos de DM pelo SG C na Grande São Paulo entre 2003 e 2005 e, através da caracterização de isolados deste SG do período de 1976 a 2005, demonstraram alternância de três complexos clonais causando DM: o complexo ST-11 (fenótipo 2a:P1.5,2) foi substituído pelo ST-8 (fenótipo 2b:P1.3) e este pelo complexo ST-103 (fenótipo P1.14-6), que prevalece atualmente.

Um estudo sobre a epidemiologia da DM no Rio Grande do Sul no período de 1995 a 2003 revelou uma diminuição de 50% no número total de casos ao longo deste período, com taxa de letalidade de 22%. Os fenótipos B:4,7:P1.19,15, B:15:P1.7,16 e B:NT:P1.3 foram responsáveis por quase 50% do total de casos do período. A partir da caracterização de isolados de casos ocorridos no ano 2000, obteve-se prevalência de 68% dos isolados pertencendo ao complexo clonal ST-32/ET-5, 16% ao complexo ST-103, 7% ao complexo ST-461, 2% ao complexo ST-23/cluster A3 e 7% dos STs não pertencendo a nenhum complexo clonal conhecido (Baethgen *et al.*, 2008).

## JUSTIFICATIVA

Considerando as altas taxas de letalidade devidas às doenças invasivas causadas por *N. meningitidis* e a possibilidade de ocorrência de seqüelas neurológicas após a meningite, o estudo microbiológico, genético e populacional desta bactéria mostra-se imprescindível no âmbito da saúde pública, a fim de melhor controlar, tratar e prevenir estas infecções.

O número de isolamentos de meningococo através da cultura não é suficiente para obter-se uma exata quantificação dos casos devidos a este agente. Apenas 33% dos casos de DM notificados no RS entre 2003 e 2005 foi confirmado através de crescimento em cultura. Além disso, aproximadamente 33% dos casos de meningite notificados no RS não têm a etiologia especificada, sendo notificados como meningite bacteriana, meningite não especificada ou meningite por outras etiologias, conforme a Classificação Internacional de Doenças (C.I. Kmetzsch, Secretaria da Saúde do RS, comunicação pessoal). Assim, existe a necessidade de estabelecer novas metodologias para a identificação do meningococo, que ofereçam vantagens em relação às já existentes, como aumento da sensibilidade e não interferência da utilização de antimicrobianos.

Pelo potencial de causar epidemias e pela história de epidemias e surtos descritos no Brasil, a DM demanda constantes estudos das características microbiológicas, genéticas e populacionais do meningococo, a fim de monitorar os casos. A vigilância epidemiológica, aliada à caracterização genotípica das cepas circulantes no estado do RS, fornecem subsídios importantes para o melhor controle de surtos e epidemias, bem como para a escolha e o direcionamento de pesquisas para o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra o SG B do meningococo.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Avaliar a epidemiologia da doença meningocócica no Rio Grande do Sul, de 2003 a 2005, através da caracterização genotípica de isolados e amostras clínicas de pacientes com DM, bem como avaliar a utilização de uma técnica de PCR em tempo real para a detecção de *N. meningitidis* em amostras clínicas.

### **Objetivos específicos**

1. Dar continuidade aos estudos anteriores no monitoramento da DM no Estado, coletando as informações epidemiológicas referentes aos casos de doença meningocócica ocorridos no RS nos anos de 2003, 2004 e 2005, comparando-as a períodos anteriores.
2. Caracterizar os isolados viáveis e amostras clínicas de pacientes que apresentaram DM no período do estudo, através de MLST.
3. Realizar o seqüenciamento das regiões variáveis do gene *porA* dos isolados e amostras clínicas de pacientes com DM.
4. Avaliar uma técnica de PCR em tempo real para a detecção do DNA de *N. meningitidis* em amostras clínicas de pacientes com suspeita de DM.



## PARTE II

## Capítulo 1

artigo aceito para publicação no periódico Journal of Infection

### **High prevalence of *Neisseria meningitidis* hypervirulent lineages and emergence of W135:P1.5,2:ST-11 clone in southern Brazil**

**High prevalence of *Neisseria meningitidis* hypervirulent lineages and emergence of W135:P1.5,2:ST-11 clone in southern Brazil**

Running title: Meningococci characterization in RS-Brazil

Authors: Luciana Weidlich<sup>a,b\*</sup>, Ludmila F. Baethgen<sup>b</sup> Leonard W. Mayer<sup>c</sup>; Camile Moraes<sup>b</sup>; Cecília C. Klein<sup>b</sup>; Luciana S. Nunes<sup>d</sup>; Sílvia da S. Rios<sup>e</sup>; Claudete I. Kmetzsch<sup>f</sup>, Maria L. R. Rossetti<sup>b</sup> and Arnaldo Zaha<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-graduação em CB: Bioquímica – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPGBioq – UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>b</sup>Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (CDCT/FEPPS), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>c</sup>Meningitis and Vaccine Preventable Diseases Branch, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, GA, United States of America.

<sup>d</sup>Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Cbiot – UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>e</sup>Seção de Bacteriologia do Instituto de Pesquisas Biológicas – Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul (IPB/LACEN/RS), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>f</sup>Divisão de Vigilância Epidemiológica da Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, Brazil.

## **ABSTRACT**

**Objectives.** The aim of this study was to characterize *Neisseria meningitidis* strains causing invasive disease in Rio Grande do Sul (RS), during 2003 to 2005, monitoring the occurrence of hypervirulent lineages, as well as to determine the diversity of PorA VR types for the corresponding isolates and clinical specimens.

**Methods.** Isolates and clinical specimens were characterized by MLST and PorA VR typing.

**Results.** This study demonstrated high prevalence of some hypervirulent lineages and emergence of new ones, including the emergence of lineages W135:P1.5,2:ST-11complex, and C:P1.22,14-6:ST-103complex. These lineages are probably responsible for the increasing incidence of serogroups C and W135, despite the overall decrease in serogroup B cases during the period. The most prevalent complex was serogroup B ST-32/ET-5 complex. The most prevalent PorA types found for serogroup B were P1.19,15, P1.7,16, and P1.18-1,3, representing a different distribution of PorA types compared to other states of Brazil.

**Conclusions.** This study highlights the importance of monitoring each population, even within the same country. The different distribution of PorA VR types in RS has implications in vaccine design and efficacy. Detailed and accurate meningococcal characterization is an important element in studies of meningococcal epidemiology, population biology, and evolution and provides information for the design of control strategies.

## **KEYWORDS**

*Neisseria meningitidis*; epidemiology; hypervirulent lineages; PorA VR types; Serogroup B vaccine

## INTRODUCTION

Meningococcal disease (MD), in both endemic and epidemic forms, is an important cause of morbidity and mortality in developing countries, as well as in the industrialized world.<sup>1</sup> Although incidence is low in countries with endemic MD, high case fatality rates (CFR) have been described in many countries, varying from 7% up to 22%, consisting in an important public health problem.<sup>2,3,4</sup> Outbreaks usually account for less than 5% of total cases reported, but the CFR is usually higher during outbreaks than for sporadic cases.<sup>3</sup>

In Brazil, in the last few years (2000 to 2006), 3795 (+/- 637) cases of MD were reported annually, with incidence rates of 2.15 (+/-0.45) cases per 100000 inhabitants. During this period, serogroup B was the most prevalent in Brazil. The CFR in the whole country was 20% (+/-0.70) for the same period (<http://portal.saude.gov.br/saude>; <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2006/matriz.htm>).

Rio Grande do Sul (RS) is the southernmost state of Brazil, with 10.6 million inhabitants in 2007 (<http://www.ibge.gov.br>). There was an epidemic period between years 1995 and 2000, and the pattern of disease became endemic again after 2000.<sup>2</sup> Incidence of meningococcal disease between 2003 and 2005 was 1.54 (+/-0.18) per 100000 inhabitants (Epidemiological Surveillance Office of RS, personal communication).

In the last years, several advances have been made in our understanding of meningococcal biology and pathogenesis, global epidemiology, transmission, carriage, host susceptibility and pathophysiology.<sup>5</sup> Although there is high genetic variability of *Neisseria meningitidis*, only some 'hypervirulent lineages', composed by a minority of genotypes and antigenic types, account for the majority of the cases of invasive disease.<sup>6</sup>

Immunological and molecular methods, such as multilocus sequence typing (MLST), have been used to monitor the spread of hypervirulent lineages worldwide, in order to determine the pattern of disease and to establish control measures for each specific population.<sup>7,8,9</sup>

Despite the use of serogroup B specific vaccines in some settings, the development of broadly effective vaccine against *N. meningitidis* serogroup B is still a challenge that has not been accomplished despite decades of active research.<sup>10</sup> Various outer membrane proteins (OMPs) have been proposed as vaccine components, such as PorA, a highly immunogenic OMP, and specific antibodies induced by outer membrane vesicle (OMV) vaccines are generally subtype specific, as well as exhibit both bactericidal and opsonic functions.<sup>11,12</sup> The high antigenic diversity of PorA has implications for epidemiological analysis and vaccine design, so, monitoring the subtypes of *N. meningitidis* circulating strains in each specific population is fundamental for vaccine target choices and for monitoring vaccine efficacy.<sup>13</sup>

The aim of this study was to characterize *N. meningitidis* strains causing invasive disease in RS, monitoring the occurrence of hypervirulent lineages and emergence of new ones, as well as to determine the PorA types for the isolates and from DNA in clinical specimens, defining the PorA diversity pattern in this population.

## **MATERIALS AND METHODS**

**Population, time and location.** Rio Grande do Sul state, located in the south of Brazil, has a population of 10.6 million inhabitants as of 2007 (<http://www.ibge.gov.br>). Retrospective review of surveillance data reported to the Epidemiological Surveillance Office of RS (Secretaria de Vigilância em Saúde/RS) identified isolates and clinical specimens obtained from patients with MD that were sent to IPB-LACEN/RS for laboratory confirmation of MD, during the 2003-2005 period.

**Phenotypic characterization of meningococcal isolates and clinical specimens.** The isolates were serogrouped by slide agglutination with polyclonal antisera prepared at Instituto Adolfo Lutz against serogroups A, B, C, W135, X, Y, Z and 29E.<sup>14</sup> For the clinical specimens, *N. meningitidis* infection and serogroup was confirmed by slide agglutination (Pastorex® Meningitis 61718, Sanofi Diagnostics Pasteur) and counterimmunoelectrophoresis (CIE).<sup>15</sup> Isolates and specimens serogrouped as Y/W135 were analyzed by real time PCR for determination of serogroup, as described by Mothershed *et al.* (2004).<sup>16</sup>

**Genotypic characterization of meningococcal isolates and clinical specimens.**

*Multilocus sequence typing (MLST).* Sixty one isolates and 16 clinical specimens, cerebrospinal fluid (CSF) or serum, were available for genotypic characterization. This sample corresponds to all viable isolates and available clinical specimens from the period, at the time of study. These isolates and clinical specimens were typed by MLST as described by Maiden *et al.*(1998)<sup>8</sup>, with some modifications, using the primers listed on *Neisseria* MLST website (<http://pubmlst.org/neisseria>). PCR was performed with 2 µL of boiled bacterial whole cell suspension from isolates. DNA purification from clinical specimens was performed using QiaAmp DNA mini kit (Qiagen Inc., Valencia, CA), and 2 µL of purified DNA was amplified and then visualized on a 1.2% E-gel (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA). If no amplification product was visualized in the gel, the PCR was repeated with 4 and 6 µL of DNA. The amplified fragments were purified by QIA-quick PCR purification kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) and sequenced with Big Dye Terminator Cycle Kit version 3.1 (Applied Biosystems). Sequencing products were purified by using Centri-Sep spin columns (Princeton Separations, Adelphia, N.J.) and were resolved on an Applied Biosystems 3100 automated DNA sequencing system. Sequence data were analyzed using the software Lasergene version 6 (DNASTAR Inc., Madison,

Wisconsin) and submitted to *Neisseria* MLST website to assign sequence types (STs) and clonal complexes.<sup>17</sup>

*PorA VR Typing.* The 61 isolates and 16 clinical specimens typed by MLST had a partial sequence of PorA gene amplified according to the protocols described previously, with modification in some primers, as follows: *porA* gene (210- 5'-ATG CGA AAA AAA CTT ACC GCC CTC-3' and R773y- 5'-GGC ATA G<sub>y</sub>T CCC GGC AAA ACC GCC AT-3'), VR1 (U86- 5'-GCC CTC GTA TTG TCC GCA CTG-3' and 103L-5'-GAG CAA GAC GTA TCC GTT-3'), VR2 (8Uyy-5'-GG<sub>y</sub> GA<sub>y</sub> TCG TAG CGT ACG GA-3' and R773y).<sup>18,19</sup> The amplified fragments were sequenced and analyzed as above. The sequences obtained were submitted to *N. meningitidis* PorA variable regions database (<http://neisseria.org/nm/typing>) to identify the VR families.

### **Statistical analysis**

The Chi-square test with Mantel-Haenszel correction was used to analyze the results and a p-value <0.05 was considered significant. Analyses were made with the software EpiInfo (version 6.04d, Centers for Disease Control and Prevention, USA).

## **RESULTS**

From January 2003 to December 2005, 493 cases of MD were reported to the Epidemiological Surveillance Office of RS, representing an incidence of 1.54 cases/100000 population, considering all ages. The incidence rate can achieve 23.5/100000 for children less than 1 year and 7/100000 for children between 1 and 4 years old (Epidemiological Surveillance Office of RS, personal communication).

The criteria used by the Epidemiological Surveillance Office to define the cases as MD were: isolation of meningococcus by culture (33%), clinical signs (28%), latex agglutination



and/or CIE (23%), identification of Gram negative diplococci (11%) and other criteria such as epidemiologic link, necropsy or unspecified (5%).

About 44% of all isolates and clinical specimens from notified cases in the period were serogrouped, serogroup B representing 64%, serogroup C 18%, serogroup W135 17%, and serogroup Y 1%. serogroups A, 29E and X were not detected during the study period. The serogroup distribution among the isolates selected for this study was similar: 70% serogroup B, 12% serogroup C and 18% serogroup W135. All isolates and specimens serogrouped as Y/W135 were confirmed by PCR to belong to serogroup W135.

The mean serogroup W135 prevalence increased significantly in the period of 2003 to 2005 (17.8%), compared to 3.2% serogroup W135 cases notified between 1995 and 2002 ( $p < 0.001$ ). There was also a significant increase in serogroup C ( $p < 0.05$ ) and decrease in serogroup B prevalences ( $p < 0.01$ ) in 2003-2005 period, compared to the 3 previous years (non-epidemic period) (Figure 1).

MLST identified 32 different STs among 77 isolates and specimens from years 2003 to 2005, distributed in 9 clonal complexes. Forty (52%) isolates and clinical specimens belong to ST-32/ET-5 complex, 11 (14%) to ST-11/ET-37 complex, 12 (16 %) to ST-103 complex, 6 (8%) to ST-41/44 complex/lineage 3, and 8 (10%) belong to other STs (Table 1). From the total of 32 STs found, 17 (53%) were new STs, and 11 alleles were identified for the first time in this study. New alleles were about evenly distributed among loci, but 6 (55%) belonged to strains in ST-32 clonal complex. Only 7 genes from 5 clinical specimens could not be totally amplified or sequenced, so we could not assign STs for these specimens. However, it was possible to classify all of them into clonal complexes, since we obtained 5 or 6 alleles for each specimen.

It was possible to amplify the target fragment of *porA* gene for all 77 isolates and specimens previously characterized by MLST. Sequencing of *porA* variable regions revealed 19

different PorA VR types, from which 3 VR2 sequences were novel. P1.19,15 was the most prevalent subtype (27%), followed by P1.7,16 (20%), P1.5,2 (14%), P1.18-1,3 (9%) and P1.22,14-6 (8%) (table 1). P1.19,15 and P1.7,16 together account for 87% of ST-32 complex isolates and specimens and are almost all serogroup B except for 2 serogroup C specimens. Of 14 serogroup W135 genotyped, 11 (79%) belonged to ST-11 clonal complex and were subtype P1.5,2.

## **DISCUSSION**

Molecular characterization studies of *N. meningitidis* strains causing invasive disease is fundamental for the understanding of the events related to epidemiological spread of the bacteria in the population.

The results achieved in this study are consistent with the results presented to 1995-2003 period by Baethgen *et al.* (2008)<sup>2</sup>, and comparing both study periods we observed that the MD incidence has remained constant in Rio Grande do Sul over the last several years, characterizing the endemic period seen since year 2000. The incidence of MD in Brazil was around 2 cases per 100,000 population, similar to other countries presenting endemic situation, such as USA and some European countries.<sup>3,20</sup> No epidemic of MD has been documented in RS state or in Brazil since year 2000. In RS, the incidence during 2003 to 2005 period continued to be significantly higher for infants under 1 year age (23.5/100,000 population) and between 1 and 4 years age (7/100000 population), compared to other ages (0.1 to 2.9 cases/100000 population) as demonstrated previously in other regions.<sup>21</sup> It was described previously that attack rates and CFR can be 20 times higher among children when compared to adults, in endemic situations.<sup>22</sup>

The characterization of clinical specimens by MLST and PorA typing can be done for almost all specimens, as demonstrated previously.<sup>23</sup> In this study, it was possible to obtain STs

for 11 CSF specimens. Only 5 specimens could not have a complete ST assigned, because 7 genes from these specimens could not be amplified, but it was possible to determine the clonal complex and PorA VR types for all specimens. Considering that only 33% of MD cases in this period were confirmed by culture, the characterization of meningococci directly from clinical specimens by MLST and PorA VR typing is a very useful tool.

Baethgen *et al.* (2008)<sup>2</sup> characterized about 70% of isolates identified in 2000 from RS as belonging to the hypervirulent lineage ST-32/ET-5 clonal complex. In this study, 57 (74%) isolates and specimens belonged to 3 hypervirulent lineages. ST-32 complex continues to be the most prevalent, accounting for 52% of all isolates and specimens analyzed in this study. However, a changing pattern in diversity of hypervirulent lineages seems to be occurring in RS with the appearance of 3 previously undetected clonal complexes. The lineages ST-11/ET-37 complex, ST-103 complex and ST-41/44 complex/lineage 3, account for 11 (14%), 14 (16%), and 6 (8%) isolates and clinical specimens analyzed in RS in 2003 to 2005, respectively. These were previously found in other states of Brazil, but not in RS.<sup>2,24,25</sup> These hypervirulent clones have been reported to cause outbreaks and epidemics worldwide, reinforcing the importance of molecular characterization of MD cases in order to monitor the spread of these lineages and to establish control measures for the disease.<sup>26,27,28</sup>

There was a higher genetic diversity in isolates within the ST-32 complex than was seen between 1995 and 2003, with 18 different STs, 8 of them novel. All 6 isolates belonging to ST-41/44 complex (that was not described in RS previously) were novel STs, in contrast with ST-11 complex, for which one new ST was found among 11 isolates. The genetic diversity found by MLST was confirmed by the PorA VR typing, which identified 19 different PorA types within the 77 isolates and specimens analyzed, including 3 new variants. The PorA VR typing, that analyzes part of *porA* gene sequence, overcome the limitations presented by serosubtyping, and

allows complete characterization, including the identification of new variants within the families.<sup>29</sup>

The subtype variability has a direct influence in vaccine development and monitoring, as well as in disease control measures. So, with the *N. meningitidis* genetic variability being demonstrated worldwide<sup>30,31</sup>, the monitoring of circulating subtypes by PorA VR typing is essential.

Subtype P1.19,15, was the most prevalent during 1995 to 2003<sup>2</sup> and also 2003 to 2005, accounting for 27% of total isolates and specimens in the recent time period. This is also the most prevalent subtype found in other states of Brazil, ranging from 48% to 57% of isolates analyzed by PorA VR typing or serosubtyping<sup>24,29,32,33</sup> The second most prevalent subtype found in other states of Brazil was P1.7,1, which was not found in RS. In contrast, RS had a high prevalence of subtype P1.7,16 (20% of total cases and 28% of serogroup B cases), which was only seen as around 2% of isolates in other regions of Brazil. This subtype seems to be more prevalent in the states from the south administrative region of Brazil, composed by RS, Santa Catarina and Paraná.<sup>33</sup>

P1.19,15 accounts for 15% and P1.7,16 for 17% of serogroup B cases of MD in Argentina, a neighbouring country with the south region of Brazil, which could be a possible source of strains, especially for subtype P1.7,16, not prevalent in other regions of Brazil<sup>34</sup> These findings confirm the trend presented by Baethgen *et al.* (2008)<sup>2</sup>, that RS state has a different subtype distribution compared to other states of the country, directly influencing on the definition of which PorA types should be included in the OMV vaccines that are under development and evaluation in Brazil. It has been indicated previously that a bivalent vaccine containing P1.19,15 and P1.7,1 would target 77% of MD in the country<sup>29</sup>, however, in RS this vaccine would target only about 35% of serogroup B cases. It would be necessary for a vaccine to contain P1.19,15,

P1.7,16 and P1.18-1,3 to reach protection of about 74% of serogroup B meningococcus circulating in RS.

Some changes in the serogroup distribution may possibly be due to the emergence of new clones. Serogroups C and W135 presented increasing prevalences, while serogroup B showed decreasing prevalences in the period between 2003 and 2005, compared to previous years.

The subtype W135:P1.5,2:ST-11 complex was the third most prevalent clone found in RS during the 2003 to 2005 period, representing 14% of isolates and specimens analyzed. This is the same genotype as the 2000 Hajj related clone<sup>35,36,37,38,39</sup> The significant increase in number of serogroup W135 cases in RS may be related to the emergence of the hypervirulent clone W135:P1.5,2: ST-11(ST-11/ET-37cc). As described previously by Baethgen *et al.* (2008)<sup>2</sup>, only 3 cases of phenotype P1.5,2 were identified between 1995 and 2003, but all occurred before the year 2000. Rio de Janeiro and Argentina are also seeing similar increases in serogroup W135 MD.<sup>40,41</sup> In addition to outbreaks and epidemics, the Hajj clone is associated with high CFR rates<sup>42</sup>, therefore, molecular characterization of meningococcal invasive strains as well as careful analysis of epidemiological data, not only in RS, but in the entire country, are essential to detect and prevent the spread of this strain by appropriate available vaccines.<sup>43</sup>

Serogroup C was identified in 9 (12%) cases in this study, from which 6 (67%) have the genotype C:P1.22,14-6:ST-103 complex. serogroup C:P1.14-6 was the most prevalent serosubtype in greater São Paulo in a study reporting an increase of this phenotype in the last few years<sup>25</sup> Sequencing of some of these isolates from São Paulo revealed they have the genotype P1.22,14-6 (A.P.Lemos, personal communication), the same as RS strains. Considering the possibility of a genetic and epidemiological relation between RS and São Paulo strains, this fact would explain the significant increase of serogroup C in RS during 2003 to 2005, what is concerning because of the possibility of a clonal distribution of this subtype throughout the whole

country, causing an epidemic of serogroup C MD. Efforts are needed to monitor this clone spread and to evaluate the future need for serogroup C vaccination campaigns.

This study highlights the importance of monitoring all regions and populations within the same country, because large discrepancies in antigenic distribution can be observed among different regions of a large country, such as Brazil. Dynamics of *N. meningitidis* populations are not well understood neither is the reason for the existence of so diverse meningococcal populations, and so it is not possible to predict the effects of using vaccines that do not offer comprehensive protection against MD. Consequently, detailed and accurate meningococcal strain characterization is therefore a particularly important element of studies of meningococcal epidemiology, population biology and evolution<sup>7</sup>, and should be performed as a systematic protocol to provide information to assist with appropriate control measures.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

L.W., L.F.B. and C.C.K were supported by fellowships from CNPq and CAPES. This study was supported by Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (CDCT-FEPPS), Brazil, and Centers for Disease Control and Prevention (CDC), USA.

This publication made use of the *Neisseria* Multilocus Sequence Typing website (<http://pubmlst.org/neisseria/>) developed by Keith Jolley and Man-Suen Chan and sited at the University of Oxford (Jolley et al. 2004). The development of this site has been funded by the Wellcome Trust and European Union. We also made use of the *N. meningitidis* PorA typing web site (<http://neisseria.org/nm/typing/>), which was developed by Keith Jolley.

## **CONFLICT OF INTEREST**

The authors have no conflict of interest declared.

## REFERENCES

1. Maiden, MCJ & Caugant, DA. The population biology of *Neisseria meningitidis*: implications for meningococcal disease, epidemiology and control. In: Frosch M, Maiden M, eds. Handbook of Meningococcal Disease. Weinheim: Wiley-VGH-Verlag; 2006: 427–80.
2. Baethgen LF, Weidlich L, Moraes C, Klein C, Nunes LS, Cafrune PI, et al. Epidemiology of meningococcal disease in southern Brazil from 1995 to 2003, and molecular characterization of *Neisseria meningitidis* using multilocus sequence typing. Trop Med Int Health 2008; 13(1):31-40, doi:10.1111/j.1365-3156.2007.01970.x.
3. Brooks R, Woods CW, Benjamin DK Jr, Rosenstein NE. Increased case-fatality rate associated with outbreaks of *Neisseria meningitidis* infection, compared with sporadic meningococcal disease, in the United States, 1994-2002. Clin Infect Dis 2006; 43(1):49-54.
4. Zarantonelli ML, Lancellotti M, Deghmane AE, Giorgini D, Hong E, Ruckly C, et al. Hyperinvasive genotypes of *Neisseria meningitidis* in France. Clin Microbiol Infect 2008; 14(5):467-72, doi:10.1111/j.1469-0691.2008.01955.x.
5. Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. Lancet 2007; 369(9580):2196-210,doi:10.1016/S0140-6736(07)61016-2
6. Urwin R, Russell JE, Thompson EA, Holmes EC, Feavers IM, Maiden MC. Distribution of surface protein variants among hyperinvasive meningococci: implications for vaccine design. Infect Immun 2004; 72(10):5955-62, doi: 10.1128/IAI.72.10.5955-5962.2004.
7. Brehony C, Jolley KA, Maiden MC. Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease. FEMS Microbiol Rev 2007; 31(1):15-26, doi:10.1111/j.1574-6976.2006.00056.x.
8. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95(6):3140-5.
9. Dyet KH, Martin DR. Clonal analysis of the serogroup B meningococci causing New Zealand's epidemic. Epidemiol Infect 2006; 134(2):377-83, doi:10.1017/S0950268805004954
10. Harrison LH. Prospects for vaccine prevention of meningococcal infection. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(1):142-64, doi: 10.1128/CMR.19.1.142-164.2006.
11. Aase A, Høiby EA, Michaelsen TE. Opsonophagocytic and bactericidal activity mediated by purified IgG subclass antibodies after vaccination with the Norwegian group B meningococcal vaccine. Scand J Immunol 1998; 47(4):388-96.

12. Jessouroun E, da Silveira IF, Larangeira AP, Pereira S, Fernandes SA, Rabinovitch L, et al. Outer membrane vesicles (OMVs) and detoxified lipooligosaccharide (dLOS) obtained from Brazilian prevalent *N. meningitidis* serogroup B strains protect mice against homologous and heterologous meningococcal infection and septic shock. *Vaccine* 2004; 22(20):2617-25, doi:10.1016/j.vaccine.2003.12.009
13. Feavers IM, Fox AJ, Gray S, Jones DM, Maiden MC. Antigenic diversity of meningococcal outer membrane protein PorA has implications for epidemiological analysis and vaccine design. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996; 3(4):444-50.
14. Alkmin, MGA, Shimizu, SH, Landgraf, IM, Gaspari, EN & Melles, CEA. Production and immunochemical characterization of *Neisseria meningitidis* group B antiserum for the diagnosis of purulent meningitis. *Braz J Med Biol Res* 1994; 27:1627-34.
15. Takeda AK, Umekita LF, Boscardin NB, Meles CAE, Taunay A E. Imunoelctroforese cruzada no diagnóstico de meningite causada por *Haemophilus influenzae* tipo b. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 1979; 39:165-169.
16. 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(1):320-8, doi: 10.1128/JCM.42.1.320-328.2004.
17. Jolley KA, Chan MS, Maiden MC. mlstdbNet - distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics* 2004; 5:86, doi: 10.1186/1471-2105-5-86.
18. Feavers IM, Maiden MC. A gonococcal porA pseudogene: implications for understanding the evolution and pathogenicity of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* 1998; 30(3):647-56.
19. Sacchi CT, Lemos AP, Brandt ME, Whitney AM, Melles CE, Solari CA, et al. Proposed standardization of *Neisseria meningitidis* PorA variable-region typing nomenclature. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5(6):845-55.
20. Cartwright K, Noah N, Peltola H, Meningococcal Disease Advisory Board. Meningococcal disease in Europe: epidemiology, mortality, and prevention with conjugate vaccines. Report of a European advisory board meeting Vienna, Austria, 6-8 October, 2000. *Vaccine* 2001; 19(31):4347-56, doi:10.1016/S0264-410X(01)00205-5
21. Gray SJ, Trotter CL, Ramsay ME, Guiver M, Fox AJ, Borrow R, Mallard RH, Kaczmarski EB. Epidemiology of meningococcal disease in England and Wales 1993/94 to 2003/04:



contribution and experiences of the Meningococcal Reference Unit. *J Med Microbiol* 2006; 55(Pt 7):887-96, doi: 10.1099/jmm.0.46288-0.

22. Tzeng L, Stephens DS. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*, *Microbes Infect* 2000; 2:687–700, doi:10.1016/S1286-4579(00)00356-7.

23. Birtles A, Hardy K, Gray SJ, Handford S, Kaczmarski EB, Edwards-Jones V, et al. Multilocus sequence typing of *Neisseria meningitidis* directly from clinical isolates and clinical specimens and application of the method to the investigation of meningococcal disease case clusters. *J Clin Microbiol* 2005; 43(12):6007-14, doi: 10.1128/JCM.43.12.6007-6014.2005.

24. de Filippis I, Vicente AC. Multilocus sequence typing and repetitive element-based polymerase chain reaction analysis of *Neisseria meningitidis* isolates in Brazil reveal the emergence of 11 new sequence types genetically related to the ST-32 and ST-41/44 complexes and high prevalence of strains related to hypervirulent lineages. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 53(3):161-7, doi:10.1016/j.diagmicrobio.2005.06.015.

25. Lemos AP, Yara TY, Gorla MC, de Paiva MV, de Souza AL, Gonçalves MI, et al. Clonal distribution of invasive *Neisseria meningitidis* serogroup C strains circulating from 1976 to 2005 in greater Sao Paulo, Brazil. *J Clin Microbiol* 2007; 45(4):1266-73, doi: 10.1128/JCM.02510-06.

26. Dyet K, Devoy A, McDowell R, Martin D. New Zealand's epidemic of meningococcal disease described using molecular analysis: implications for vaccine delivery. *Vaccine* 2005 Mar; 23(17-18):2228-30, doi:10.1016/j.vaccine.2005.01.050.

27. Takahashi H, Kuroki T, Watanabe Y, Tanaka H, Inouye H, Yamai S, Watanabe H. Characterization of *Neisseria meningitidis* isolates collected from 1974 to 2003 in Japan by multilocus sequence typing. *J Med Microbiol* 2004; 53(Pt 7): 657-62, doi: 10.1099/jmm.0.45541-0

28. Zhang X, Shao Z, Zhu Y, Xu L, Xu X, Mayer LW, et al. Genetic characteristics of serogroup A meningococci circulating in China, 1956-2005. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(6):555-61, doi:10.1111/j.1469-0691.2008.01977.x.

29. Sacchi CT, Lemos AP, Popovic T, De Moraes JC, Whitney AM, Melles CE, et al. Serosubtypes and PorA types of *Neisseria meningitidis* serogroup B isolated in Brazil during 1997-1998: overview and implications for vaccine development. *J Clin Microbiol* 2001; 39(8): 2897-903, doi: 10.1128/JCM.39.8.2897-2903.2001.

30. Vicente D, Esnal O, Michaus L, López de Goicoechea MJ, Cisterna R, Pérez-Trallero E. Prevalence of genosubtypes (PorA types) of serogroup B invasive meningococcus in the north of Spain from 2000 to 2003. *J Med Microbiol* 2005; 54(Pt 4):381-4, doi:10.1099/jmm.0.45855-0.
31. Sacchi CT, Whitney AM, Popovic T, Beall DS, Reeves MW, Plikaytis BD, et al. Diversity and prevalence of PorA types in *Neisseria meningitidis* serogroup B in the United States, 1992-1998. *J Infect Dis* 2000; 182(4): 1169-76, doi: 10.1086/315833.
32. de Filippis I, de Andrade CF, Silva L, Prevots DR, Vicente AC. PorA variable antigenic regions VR1, VR2, and VR3 of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C isolated in Brazil from 1999 to 2004. *Infect Immun* 2007; 75(7):3683-5, doi: 10.1128/IAI.01721-06.
33. Lemos AP, Brandão AP, Gorla MC, Paiva MV, Simonsen V, Melles CE. Phenotypic characterization of *Neisseria meningitidis* strains isolated from invasive disease in Brazil from 1990 to 2001. *J Med Microbiol* 2006; 55(Pt 6):751-7, doi: 10.1099/jmm.0.46451-0.
34. Pereira CS, Regueira M, and Mollerach M. PorA types in *Neisseria meningitidis* serogroup B isolated in Argentina from 2001 to 2003: implications for the design of an outer membrane protein-based vaccine. *J Med Microbiol* 2008; 57:338 - 342, doi:10.1099/jmm.0.47631-0.
35. Aguilera JF, Perrocheau A, Meffre C, Hahné S. W135 Working Group. Outbreak of serogroup W135 meningococcal disease after the Hajj pilgrimage, Europe, 2000. *Emerg Infect Dis* 2002; 8(8):761-7.
36. Kilic A, Urwin R, Li H, Saracli MA, Stratton CW, Tang YW. Clonal spread of serogroup W135 meningococcal disease in Turkey. *J Clin Microbiol* 2006; 44(1):222-4, doi: 10.1128/JCM.44.1.222-224.2006
37. Mayer LW, Reeves MW, Al-Hamdan N, Sacchi CT, Taha MK, Ajello GW, et al. Outbreak of W135 meningococcal disease in 2000: not emergence of a new W135 strain but clonal expansion within the electrophoretic type-37 complex. *J Infect Dis*. 2002; 185(11):1596-605, doi: 10.1086/340414.
38. Traoré Y, Njanpop-Lafourcade BM, Adjogble KL, Lourd M, Yaro S, Nacro B, et al. The rise and fall of epidemic *Neisseria meningitidis* serogroup W135 meningitis in Burkina Faso, 2002-2005. *Clin Infect Dis* 2006; 43(7):817-22, doi: 10.1086/507339
39. Taha MK, Achtman M, Alonso JM, Greenwood B, Ramsay M, Fox A, et al Serogroup W135 meningococcal disease in Hajj pilgrims. *Lancet*. 2000; 356(9248):2159, doi:10.1016/S0140-6736(00)03502-9.

40. Barroso DE, Rebelo MC. Recognition of the epidemiological significance of *Neisseria meningitidis* capsular serogroup W135 in the Rio de Janeiro region, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102(6):773-5, doi: 10.1590/S0074-02762007005000104.
41. Chiávetta L, Chávez E, Ruzic A, Mollerach M, Regueira M. Surveillance of *Neisseria meningitidis* in Argentina, 1993-2005: distribution of serogroups, serotypes and serosubtypes isolated from invasive disease. *Rev Argent Microbiol* 2007; 39(1):21-27.
42. von Gottberg A, du Plessis M, Cohen C, Prentice E, Schrag S, de Gouveia L, et al. Group for Enteric, Respiratory and Meningeal Disease Surveillance in South Africa. Emergence of endemic serogroup W135 meningococcal disease associated with a high mortality rate in South Africa. *Clin Infect Dis* 2008; 46(3):377-86, doi: 10.1086/525260.
43. Bilukha OO, Rosenstein N. Prevention and control of meningococcal disease. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 2005; 54: 1–21.

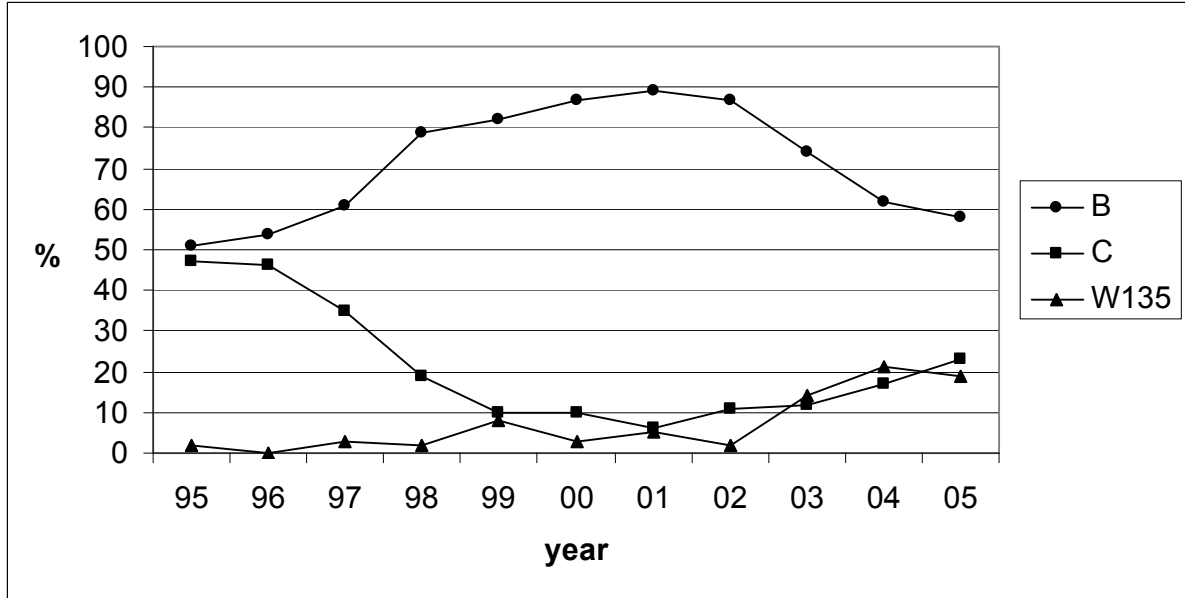


Figure 1. Distribution of *Neisseria meningitidis* serogroups in RS-Brazil, 1995 to 2005 (Epidemiological Surveillance Office of RS, personal communication).

Table 1. Prevalence of *N. meningitidis* PorA VR types and distribution among clonal complexes, STs and serogroups from 77 isolates or clinical specimens, RS, Brazil, 2003 to 2005.

MLST <sup>a</sup>		PorA VR type (number of isolates or specimens (%))																				
Clonal Complex (n/%)	ST <sup>b</sup>	SG <sup>c</sup>	PI.19.15	PI.19.16	PI.7.16	PI.7.16-75	PI.7.16-76	PI.7-2.13	PI.7.30-3	PI.5.2	PI.18-1.3	PI.22.14-6	PI.18-7.9	PI.18-7.9-8	PI.5-1.10-19	PI.19-2.13	PI.19-2.13-1	PI.18-1.30-4	PI.5-2.10-1	PI.22-1.14	PI.21.16	
	33	B	11 (14%)																			
	259	B		7 (9%)																		
	463	B		1 (1%)				1 (1%)														
	6355 <sup>d</sup>	B			2 (3%)	1 (1%)																
	32	B		1 (1%)																		
ST-32/ET-5	5707	B	2 (3%)		2 (3%)																	
complex	34	C	1 (1%)																			
(40/52%)	639	C	1 (1%)																			
	1824	B			1 (1%)																	
	3584	B																				
	3654	B	1 (1%)																			
	4786	B	1 (1%)																			
	5701	B	1 (1%)																			
	5702	B	1 (1%)																			
	5705	B							1 (1%)													
	5706	B								1 (1%)												
	6356	B	1 (1%)																			
	6357	B			1 (1%)																	
ST-11/ET-	11	W135																				
37 complex	unknown <sup>e</sup>	W135																				
(11/14%)	6395	W135																				
	103	B																				
ST-103	3779	C																				
complex	6358	B																				
(12/16%)	3780	C																				
	unknown <sup>e</sup>	C																				

MLST <sup>a</sup>		PorA VR type (number of isolates or specimens (%))																			
Clonal Complex (n/%)	ST <sup>b</sup>	SG <sup>c</sup>	P1.19,15	P1.19,16	P1.7,16-75	P1.7,16-76	P1.7-2,13	P1.7,30-3	P1.5,2	P1.18-1,3	P1.22,14-6	P1.18-7,9	P1.18-7,9-8	P1.5-1,10-19	P1.19-2,13	P1.19-2,13-1	P1.18-1,30-4	P1.5-2,10-1	P1.22-1,14	P1.21,16	
ST-41/44 complex/ lineage 3 (6/8%)	<b>5703</b> <b>5700</b> <b>6391</b> <b>6392</b>	B B B B											2 (3%) 1 (1%)	1 (1%)							
ST-461 complex (3/4%)	461	B														2 (3%)					
ST-23 complex/ cluster A3 (2/3%)	<b>6394</b> unknown <sup>e</sup> W135	W135															1 (1%)				
ST-35 complex (1/1%)	<b>5704</b>	B																		1 (1%)	
ST-174 complex (1/1%)	unknown <sup>e</sup> W135	W135																			1 (1%)
ST-8 complex (1/1%)	<b>6354</b>	C																			1 (1%)
<b>Total</b>			21 (27%)	1 (1%)	15 (20%)	1 (1%)	1 (1%)	1 (1%)	1 (1%)	11 (14%)	7 (9%)	6 (8%)	3 (4%)	1 (1%)	1 (1%)	2 (3%)	1 (1%)	1 (1%)	1 (1%)	1 (1%)	1 (1%)

<sup>a</sup>MLST, multilocus sequence typing

<sup>b</sup>ST, sequence type

<sup>c</sup>SG, serogroup

<sup>d</sup>STs and PorA types written in bold were first described in this study

<sup>e</sup>It was not possible to assign an ST, because only 5 or 6 of the genes were amplified from each of these clinical samples

## **Capítulo 2**

artigo submetido ao periódico Journal of Microbiological Methods, em formato de comunicação breve (“notes”)

**“Real-time PCR for rapid detection of meningococcal DNA  
in clinical specimens”**

**Title: Real-time PCR for rapid detection of meningococcal DNA in clinical specimens**

Authors: Luciana Weidlich<sup>a,b</sup>, Leonard W. Mayer<sup>c</sup>, Ludmila F. Baethgen<sup>b</sup>; Camile Moraes<sup>b</sup>; Cecília C.Klein<sup>b</sup>; Luciana S. Nunes<sup>b,e</sup>; Sílvia da S. Rios<sup>d</sup>; Maria L. R. Rossetti<sup>b</sup> and Arnaldo Zaha<sup>a,e\*</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-graduação em CB: Bioquímica – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPGBioq – UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>b</sup>Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (CDCT/FEPPS), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>c</sup>Meningitis and Vaccine Preventable Diseases Branch, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, GA, United States of America

<sup>d</sup>Seção de Bacteriologia do Instituto de Pesquisas Biológicas – Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul (IPB/LACEN/RS), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>e</sup>Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Cbiot – UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.



## **ABSTRACT**

Disease caused by *Neisseria meningitidis* remains as devastating infections worldwide. This study aimed to standardize a real time PCR assay to detect *N. meningitidis* DNA in clinical specimens, without DNA purification. Sensitivity of 96% and specificity of 97% were achieved testing 186 specimens.

## **KEYWORDS**

diagnosis; *Neisseria meningitidis*; real time PCR; clinical specimens

Meningitis caused by *Neisseria meningitidis* (N.men) and meningococcal disease (MD) remain as devastating infections worldwide and important causes of invasive disease in children in Brazil, with mortality rates around 20% (Baethgen *et al.*, 2008; de Moraes *et al.*, 2005). It has been increasingly difficult to detect N.men by culture, the gold standard method, probably because of the early administration of antibiotics, delays in transport, or other factors. In Brazil, only about 25% of suspected cases of MD and meningitis are culture confirmed (Ministry of Health, personal communication). Early and accurate diagnosis is essential for effective treatment, prompt prophylaxis to contacts, and epidemiological confirmation.

The aim of this study was to evaluate a real-time PCR assay, previously described to resolve latex agglutination discrepancies in isolates, to be used with clinical specimens from patients with suspected meningitis or MD (Mothershed *et al.*, 2004).

The Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul (IPB/LACEN) is the laboratory responsible for confirmation of suspected meningitis cases in the state of Rio Grande do Sul (RS) and Grupo Hospitalar Conceição (GHC) is the largest hospital in Porto Alegre, capital of RS. A total of 186 clinical specimens (9 serum and 177 cerebrospinal fluid) received by IPB/LACEN and from patients of GHC with clinical suspicion of meningitis, during 2003 through 2005, were tested by real time PCR.

Eighty-two specimens (positive controls) were from patients with meningococcal meningitis or MD confirmed by at least one laboratory test (culture, latex agglutination or counterimmunoelectrophoresis), and 104 specimens (negative controls) with negative results for meningococcal testing and positive results for other bacteria, yeasts, or from patients with viral meningitis or other diseases, defined by clinical symptoms.

Reactions were carried out with the ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA), using Taqman technology. Primers, probes (CDC Biotechnology Core Facility, Atlanta, GA) and conditions of reaction were the same used by Mothershed *et al.* (2004). The target was gene *ctrA*, unique to N.men and highly conserved among all serogroups.

In order to evaluate the use of clinical specimens without DNA purification for detection of N.men, we used two protocols: 78 positive control specimens and 20 negative were submitted to DNA purification by MagNA Pure LC System (Roche, Indianapolis, IND) and 2  $\mu$ L of DNA were applied to the PCR reaction mix; alternatively, 74 positive control specimens and 104 negative were heated to a temperature of 95°C for 5 minutes and 4  $\mu$ L were used directly in the PCR reaction mix, without DNA purification (boiling protocol). A positive control of N.men whole cell suspension was included on every run, as were multiple no-template controls. The specimens were run in duplicate, and a positive result is indicated by an increase of the measured fluorescent signal above a calculated background threshold, indicating amplification of the target sequence. The amplification was observed during 50 cycles.

The sensitivity achieved for DNA purification protocol was 100% and for the boiling protocol was 96%, since there were 3 false negative results. Considering that the sensitivity of 96% achieved for boiled clinical specimens represents a great advantage of the assay proposed here, since DNA purification methods are expensive and time-consuming, requiring a volume of specimen that is not always available, all other specimens were tested by the boiling method.

The Ct values for boiled specimens using the *ctrA* gene ranged from 15.3 to 40.0, and for purified DNA specimens from 16.5 to 40.0, and for several samples the Ct for

boiled specimens was lower than for purified DNA. It is very important to highlight that, with the exception of 3 specimens considered as false positives, all negative control specimens yielded “undetermined” results (no amplification detected within 50 cycles). Considering that one of these was clinically classified as viral meningitis, but the patient was treated with antibiotics (Negrini *et al.*, 2000), and the other 2 false positives were clinically classified as unspecified meningitis, there is a high probability that the 3 cases were meningococcal meningitis, demonstrating the capability of this PCR assay in elucidating a very frequent situation: a case of meningitis that cannot have the etiology determined by conventional methods. These results suggest that the assay does not detect low DNA samples in the same range of negative samples. From this data, it would be possible to indicate a cutoff of 40 cycles to consider a specimen as positive, but it is still prudent to observe the fluorescence variation between 40 and 50 cycles during a future validation study.

Sensitivity, specificity, negative and positive predictive values for *ctrA* PCR are presented in table 1. These findings are similar or better than some results of other PCR assays described in the literature. Using PCR or real-time PCR assays targeting *ctrA* gene, *nspA* gene, and IS1106 insertion sequence, sensitivities ranging from 88 to 100% were found for detection of N.men DNA, mostly in CSFs with DNA purification (Baethgen *et al.*, 2003, Corless *et al.*, 2001, de Fillipis *et al.*, 2005, Richardson *et al.*, 2003). Besides that, this assay has a turnaround time of about 3 hours, which can be extremely important in elucidating suspected meningitis and MD cases. The majority of the specimens tested were CSFs, so it is important to consider that a larger number of serum specimens should be carefully tested by the boiling method, because of the higher incidence of PCR inhibitors in serum or whole blood specimens. Such inhibitors

were probably the cause of one false-negative result, from a serum specimen. In the same way, the negative PCR results in 2 N.men positive CSFs are possibly due to inhibitors present in CSF but, as they were low volume specimens, it was not possible to purify DNA.

Determining the etiology is a fundamental key for surveillance and control of invasive diseases, and PCR have an important role in this context. The findings demonstrate that the boiling *ctrA* PCR assay presented here is a valuable tool for meningitis and MD diagnosis, thus stimulating the running of a validation study to increase the number of cases and test the boiling *ctrA* PCR performance as a routine assay.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Jorge Alberto Santiago Ferreira and Cintia Cichowski dos Santos, from Grupo Hospitalar Conceição, for supply of some specimens. L.W., L.F.B. and C.C.K were supported by fellowships from CNPq and CAPES. This study was supported by Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (CDCT-FEPPS), Brazil, and Centers for Disease Control and Prevention (CDC), USA.

## REFERENCES

1. Baethgen, L.F., Moraes, C., Weidlich, L., Rios, S., Kmetzsch, C.I., Silva, M.S., Rossetti, M.L., Zaha, A., 2003. Direct-test PCR for detection of meningococcal DNA and its serogroup characterization: standardization and adaptation for use in a public health laboratory. *J Med Microbiol* 52(Pt 9):793-9.
2. Baethgen, L.F., Weidlich, L., Moraes, C., Klein, C., Nunes, L.S., Cafrune, P., Lemos, A.P., Rios, S., Abreu, M.F., Kmetzsch, C., Sperb, A.F., Riley, L.W., Rossetti, M.L., Zaha, A., 2008. Epidemiology of Meningococcal Disease in Southern Brazil from 1995 to 2003, and Molecular Characterization of *Neisseria meningitidis* Using Multilocus Sequence Typing. *Tropical Medicine and International Health* 13(1): 31-40.
3. Corless, C.E., Guiver, M., Borrow, R., Edwards-Jones, V., Fox, A.J., Kaczmarek, E.B., 2001. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol* 39(4):1553-8.
4. de Moraes, J.C., Barata, R.B., 2005. Meningococcal disease in São Paulo, Brazil, in the 20th century: epidemiological characteristics. *Cad Saude Publica* 21(5):1458-71.
5. de Filippis I, do Nascimento CR, Clementino MB, Sereno AB, Rebelo C, Souza NN, Riley LW (2005) Rapid detection of *Neisseria meningitidis* in cerebrospinal fluid by one-step polymerase chain reaction of the nspA gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 51(2):85-90.
6. Mothershed, E.A., Sacchi, C.T., Whitney, A.M., Barnett, G.A., Ajello, G.W., Schmink, S., Mayer, L.W., Phelan, M., Taylor, T.H. Jr., Bernhardt, S.A., Rosenstein, N.E., Popovic, T., 2004. Use of real-time PCR to resolve slide agglutination discrepancies in serogroup identification of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 42(1):320-8.

7. Negrini, B., Kelleher, K.J., Wald, E.R., 2000. Cerebrospinal fluid findings in aseptic versus bacterial meningitis. *Pediatrics* 105(2):316-9.
8. Richardson, D.C., Louie, L., Louie, M., Simor, A.E., 2003. Evaluation of a rapid PCR assay for diagnosis of meningococcal meningitis. *J Clin Microbiol* 41(8):3851-3.

## TABLES

Table 1. Sensitivity, specificity and predictive values of the real time *ctrA* PCR assay for detection of *N. meningitidis* in clinical specimens

Assay	Sensitivity	Specificity	PPV <sup>a</sup>	NPV <sup>b</sup>
<i>ctrA</i> -purified DNA (n=98)	78/78 (100%)	20/20 (100%)	78/78 (100%)	20/20 (100%)
<i>ctrA</i> -boiling (n=178)	71/74 (96%)	101/104(97%)	71/74 (96%)	101/104 (97%)

<sup>a</sup>PPV: positive predictive value

<sup>b</sup>NPV: negative predictive value



## PARTE III

## DISCUSSÃO

A vigilância de doenças bacterianas invasivas é um elemento fundamental das estratégias de saúde pública para o controle das doenças infecciosas, assim como o estudo genético, microbiológico e populacional das bactérias causadoras.

Os estudos de caracterização molecular de cepas de *N. meningitidis* contribuem de forma importante para o entendimento dos fatores que determinam a disseminação da bactéria na população e as particularidades da epidemiologia em cada população específica (Caugant, 2008).

Comparando os dados epidemiológicos relativos ao período deste estudo aos resultados apresentados por Baethgen *et al.* (2008), relativos ao período de 1995 a 2003, é possível fazer algumas inferências acerca da epidemiologia geral da DM no RS. A incidência de DM no período de 2003 a 2005 foi de 1,54 casos por 100.000 habitantes, permanecendo constante desde o ano de 2000, caracterizando um período endêmico a partir de então. Entre os anos de 1995 e 2000, a incidência foi aproximadamente 47% maior, caracterizando um período epidêmico (Baethgen *et al.*, 2008). Situação endêmica com taxas de incidência semelhantes é descrita em vários países europeus e nos Estados Unidos (Cartwright *et al.*, 2001; Brooks *et al.*, 2006).

A incidência de 23,5/100.000 em crianças menores de 1 ano e de 7/100.000 em crianças de 1 a 4 anos é significativamente maior do que a incidência de DM nas outras faixas etárias. Além de incidência maior, crianças até 4 anos com DM podem apresentar taxas de letalidade em torno de 20 vezes superior aos adultos, em situação de doença endêmica. Não foi possível calcular a taxa de letalidade para o período do estudo, pois não há informação sobre o desfecho do caso para 66% das notificações. A taxa de fatalidade calculada para o período no Brasil foi de 19%, e no RS em anos anteriores foi de 17 a 22% (Baethgen *et al.*, 2008; <http://portal.saude.gov.br/saude>; <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2006/matriz.htm>).

Apenas 33% dos casos de DM foram confirmados por cultura e 34% foram confirmados por métodos imunológicos ou coloração de Gram, ou seja, 33% dos casos não foram confirmados laboratorialmente. Casos que não são confirmados laboratorialmente geralmente são confirmados com base em sinais clínicos ou vínculo epidemiológico, o que pode prejudicar a definição das etiologias na vigilância epidemiológica das doenças invasivas por estes agentes, gerando dados imprecisos.

Além disso, como o isolado bacteriano não é obtido para a maioria dos casos e nem todos os isolados obtidos estão viáveis no momento da caracterização, o número de isolados disponível para caracterização genotípica muitas vezes não é representativo do número total de casos. Para contornar este problema, parece ser cada vez mais importante realizar também a caracterização a partir de amostras clínicas, obtendo-se assim uma amostra mais representativa do total de casos e em relação à distribuição de SGs (Birtles *at al.*, 2005). Neste trabalho foi possível caracterizar, através de MLST e tipagem de PorA, além dos isolados bacterianos viáveis, 16 amostras clínicas correspondendo a 21% do total de espécimes caracterizados.

Do total de 439 casos notificados no período, 44% foram sorogrupoados. O SG B continuou sendo o mais prevalente no RS (64%), seguido do SG C (18%), SG W (17%) e SG Y (1%). Através destas prevalências, foi possível observar um aumento significativo dos SGs C ( $p < 0,05$ ) e W ( $p < 0,001$ ), concomitantemente à diminuição significativa do SG B ( $p < 0,01$ ). Modificações deste tipo no padrão de distribuição dos SGs devem ser investigadas a fim de determinar se são devidas a clones hipervirulentos, com potencial de causar grandes surtos e epidemias.

Verificou-se que 74% dos isolados e amostras caracterizados por MLST pertenciam a três linhagens hipervirulentas, o que representa maior diversidade de linhagens hipervirulentas, comparando ao ano de 2000, quando 70% dos isolados pertenciam a uma única linhagem

hipervirulenta, o complexo clonal ST-32 (Baethgen *et al.*, 2008). Em 2003-2005, o complexo ST-32 continuou sendo o mais prevalente, correspondendo a 52% dos casos, apresentando grande diversidade de STs. No entanto, duas linhagens hipervirulentas descritas anteriormente em outros estados do Brasil, mas não no RS, foram detectadas neste estudo: complexo ST-11 (14%) e complexo ST-41/44 (8%) (de Filippis & Vicente, 2005; Baethgen *et al.*, 2008). Esses clones hipervirulentos têm sido descritos em vários países como responsáveis por grandes surtos e epidemias, reforçando a importância da análise genotípica das cepas de *N. meningitidis* circulantes para o seu monitoramento, prevenção e controle de epidemias (Takahashi *et al.*, 2004; Dyet & Martin., 2006; Zhang *et al.*, 2008).

A diversidade genética apresentada pelo MLST foi confirmada pela tipagem das regiões variáveis do gene *porA*, que identificou 19 tipos de PorA entre os 77 isolados e amostras clínicas analisados, incluindo 3 novas variantes em VR2. O subtipo mais prevalente no RS, P1.19,15, representando 27% dos espécimes testados, foi também o subtipo mais encontrado em vários estados do Brasil, em prevalências variáveis (Sacchi *et al.*, 2001; de Filippis & Vicente, 2005; Lemos *et al.*, 2006; de Filippis *et al.*, 2007). O subtipo P1.7,16 foi o segundo mais encontrado no período do estudo (20%), diferentemente de outros estados do Brasil, onde o subtipo P1.7,1 é o segundo mais prevalente, o qual não foi detectado no RS neste estudo ou anteriormente. O subtipo P1.7,16 é encontrado em outras regiões do Brasil sempre em prevalências baixas, em torno de 2%, parecendo estar, de alguma forma, confinado à região Sul do Brasil há vários anos, principalmente ao estado do RS (Sacchi *et al.*, 2001; Lemos *et al.*, 2006). O motivo que leva a este confinamento não é evidente, podendo estar relacionado às diferenças climáticas, culturais e de origem da população (colonização) da região Sul, em relação às outras regiões do Brasil.

Estes dados confirmam a hipótese proposta por Baethgen *et al.* (2008) de que o RS apresenta uma distribuição diferente de subtipos em relação aos outros estados brasileiros

previamente estudados, influenciando diretamente na escolha de uma possível vacina baseada em OMPs, para uso no país. Alguns estudos avaliam o potencial de uma vacina baseada nos subtipos P1.19,15 e P1.7,1, sendo indicado que atingiria em torno de 77% de proteção contra o SG B no Brasil (Sacchi *et al.*, 2001; Jessouron *et al.*, 2004). No entanto, no RS, esta vacina atingiria apenas cerca de 35% dos casos devidos ao SG B. Para atingir uma cobertura de aproximadamente 74% dos meningococos SG B circulantes no RS, uma vacina baseada em OMPs deveria incluir os subtipos P1.19,15, P1.7,16 e P1.18-1,3.

Algumas vacinas baseadas em OMVs já utilizadas mostraram-se efetivas, indicando que, atualmente, este tipo de vacina parece ser o mais apropriado contra o SG B (Wong *et al.*, 2007). No entanto, alta diversidade de tipos de PorA tem sido observada em várias localidades mundialmente, o que dificulta a utilização de tais vacinas, que teriam que incorporar muitos tipos de PorA, tornando-as inviáveis tecnicamente. A partir do seqüenciamento da cepa de *N. meningitidis* MC58, novos antígenos foram descritos por vacinologia reversa e tiveram sua imunogenicidade testada (Tettelin *et al.*, 2000; Granoff *et al.*, 2001; Comanducci *et al.*, 2002; Massignani *et al.*, 2003; Jacobsson *et al.*, 2006; Koeberling *et al.*, 2007; Plested *et al.*, 2008). Recentemente, tem sido investigada a estratégia de unir outros antígenos às vacinas baseadas em OMPs, visando um aumento da cobertura vacinal, já que a maioria destes novos antígenos parece possuir menor diversidade genética do que as proteínas PorA (Fukasawa *et al.*, 2003; Koeberling *et al.*, 2007). Estas estratégias são promissoras, mas devem ser avaliadas com cautela, e sempre considerando estudos abrangentes de prevalências dos antígenos alvo na população mundial e não apenas em populações restritas a países desenvolvidos.

Quatorze por cento dos espécimes analisados foram caracterizados como W:P1.5,2:complexo ST-11, o mesmo genótipo descrito para as cepas envolvidas na epidemia que atingiu os peregrinos do Hajj na Arábia Saudita em 2000 e que tem causado surtos e epidemias,

desde então, em vários países (Taha *et al.*, 2000b; Aguilera *et al.*, 2002; Mayer *et al.*, 2002; Kilic *et al.*, 2006; Traoré *et al.*, 2006). Aumento no número de casos de DM pelo SG W135 foi descrito no Rio de Janeiro e na Argentina, mas este clone nunca foi descrito no Brasil anteriormente e sua emergência pode explicar o aumento significativo de casos do SG W135 no RS a partir de 2003 (Barroso & Rebelo, 2007; Chiávetta *et al.*, 2007).

O aumento no número de casos do SG C observado no período deste estudo pode estar relacionado à cepa C:P1.22,14-6:complexo ST-103 observada. Uma cepa classificada fenotipicamente como C:P1.14-6 foi descrita como responsável pelo aumento no número de casos de SG C na Grande São Paulo, entre 2003 e 2005 (Lemos *et al.*, 2007), sendo que alguns isolados seqüenciados demonstraram pertencer ao genótipo P1.22,14-6, idêntico às cepas circulantes no RS (A.P. Lemos, comunicação pessoal). Por isso, é válido alertar para a disseminação de um provável clone entre São Paulo e RS, para que o monitoramento dos casos de SG C seja mais detalhado no RS, a fim de evitar que uma possível epidemia devida a este clone se instale no estado.

A partir dos dados deste trabalho, torna-se notável a importância de realizar estudos de caracterização de meningococo em populações locais, ou em amostras representativas de toda a população de um país, para fazer inferências sobre as cepas circulantes na população em geral. Isto se aplica principalmente a países de grande extensão geográfica, como o Brasil, que podem apresentar grandes diferenças na epidemiologia das doenças em diferentes regiões. Conseqüentemente, a caracterização genotípica é uma ferramenta muito importante no estudo da epidemiologia, biologia populacional e evolução de *N. meningitidis*, e deveria fazer parte do protocolo de vigilância epidemiológica de rotina, a fim de fornecer informações para medidas de controle apropriadas para a DM.

A baixa taxa de isolamento bacteriano e o alto percentual de casos notificados de DM sem confirmação laboratorial chamam a atenção para a necessidade de utilização de outras técnicas para a confirmação da etiologia dos casos. Uma técnica de PCR em tempo real, padronizada anteriormente para amplificação de uma seqüência do gene *ctrA* de *N. meningitidis* a partir de isolados de cultura, foi adaptada e avaliada para a amplificação da mesma seqüência a partir de amostras clínicas, principalmente LCE (Mothershed *et al.*, 2004). As mesmas amostras clínicas foram submetidas à PCR em dois protocolos: com purificação de DNA e sem purificação de DNA, onde as amostras foram adicionadas à mistura da reação após fervura.

A PCR realizada com o DNA purificado apresentou especificidade e sensibilidade de 100%. A sensibilidade de 96% e a especificidade de 97% alcançadas para o protocolo que utilizou amostras sem extração de DNA, apesar de um pouco mais baixas do que para as amostras cujo DNA foi purificado, foram adequadas para o propósito da metodologia em questão, e estes valores foram superiores a vários outros estudos utilizando PCR, que variaram de 88 a 100% (Baethgen *et al.*, 2003; Corless *et al.*, 2001; de Phillipis *et al.*, 2005; Richardson *et al.*, 2003).

Além disso, a eliminação da etapa de purificação do DNA diminui o custo e o tempo de análise, vantagens importantes considerando a adoção desta técnica por laboratórios de referência da rede pública no Brasil, além do fornecimento mais rápido do resultado para confirmação da etiologia e adequação da terapia antimicrobiana a ser instituída. Sabe-se que o LCE é uma amostra clínica que contém, em geral, baixo nível de interferentes à PCR, por isso a realização desta técnica sem extração de DNA torna-se possível nestes casos. O soro é uma amostra clínica que possui maior quantidade de interferentes, por isso a eliminação da purificação do DNA dessas amostras deve ser avaliada mais criteriosamente, a partir de um estudo incluindo um número maior destas amostras.

É muito importante salientar o fato de que, com exceção das três amostras consideradas falso-positivas, todas as amostras utilizadas como controle negativo apresentaram resultados indeterminados, o que significa que não houve casos negativos com Ct (“cycle threshold”) na mesma faixa considerada para casos positivos.

Estes resultados demonstram ser esta uma técnica apropriada como método de diagnóstico de DM, a partir de amostras clínicas, devendo seguir ainda uma fase de validação na rotina laboratorial, a fim de comprovar os resultados aqui apresentados. Por tratar-se de um sistema onde a amplificação e a detecção são realizadas no mesmo tubo fechado, a PCR em tempo real oferece grandes vantagens como diminuição do risco de contaminação das reações e principalmente do ambiente, diminuindo o risco de contaminação das reações subsequentes. O sistema requer consideravelmente menos manipulação e sua realização é mais simples que o sistema de PCR convencional. Maior agilidade e aumento da sensibilidade do método, devido ao sistema e reagentes utilizados, são outras vantagens apresentadas pelo método (Espy *et al.*, 2006; Mothershed *et al.*, 2006).



## CONCLUSÕES

1. Através deste estudo, foi possível dar continuidade aos estudos de monitoramento epidemiológico da DM no RS, comparando-se o período estudado com períodos anteriores. Observou-se que o período endêmico, iniciado no ano 2000, manteve-se com incidências constantes até 2005, com diferenças na distribuição dos SGs em relação a períodos anteriores.
2. A caracterização de *N. meningitidis* por MLST no período de 2003 a 2005 no estado do RS demonstrou alta prevalência de cepas geneticamente relacionadas a clones hipervirulentos, e alta diversidade entre as cepas do complexo mais prevalente, ST-32.
3. A tipagem de PorA confirmou a diversidade desta proteína na população de meningococos causando DM no RS e forneceu informações para confirmar a hipótese previamente proposta de que o RS possui distribuição diferente de tipos de PorA em relação a outros estados brasileiros estudados, o que influencia diretamente na escolha de uma vacina para utilização no Brasil. Através da caracterização molecular foi possível indicar os motivos para o aumento de casos pelos SGs W135 e C no período: a emergência do clone hipervirulento de importância mundial W:P1.5,2:complexo ST-11 e a presença do clone C:P1.22,14-6:complexo ST-103, possivelmente relacionado geneticamente ao clone C:P1.14-6:complexo ST-103, descrito como responsável por grande aumento do número de casos por este sorogrupo em São Paulo.
4. Os resultados obtidos na utilização de uma técnica de PCR em tempo real para a detecção de *N. meningitidis* a partir de amostras clínicas foram adequados para a sua utilização no diagnóstico de casos de DM, mesmo excluindo a etapa de purificação de DNA, o que torna a técnica mais acessível para uso na rede pública de saúde.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

A partir dos resultados deste trabalho, espera-se incentivar as autoridades de saúde do estado do RS a apoiar a criação de um programa regular de caracterização molecular das cepas de meningococo, a fim de detectar surtos e prevenir possíveis epidemias, já que o estado possui infraestrutura para isso.

Além disso, a equipe deve acompanhar o estudo de novos antígenos candidatos a vacinas e o desenvolvimento de novas vacinas contra o SG B do meningococo, a fim de manter atualizada a caracterização da população do estado frente à possibilidade de uso dessas vacinas em desenvolvimento.

A técnica de PCR avaliada neste trabalho deve passar por testes de validação, sendo utilizada na rotina de investigação clínica, concomitantemente aos métodos convencionais de identificação do meningococo, a partir de diferentes amostras clínicas, a fim de determinar se os resultados demonstrados neste trabalho confirmam-se na rotina laboratorial. Se os resultados dos testes de validação forem adequados, as técnicas poderão ser utilizadas pelo CDCT ou LACEN na confirmação dos casos de DM, e por outros laboratórios que desejarem utilizá-las para auxiliar no diagnóstico da DM.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera JF, Perrocheau A, Meffre C, Hahne S, W135 Working Group. Outbreak of serogroup W135 meningococcal disease after the Hajj pilgrimage, Europe, 2000. *Emerg Infect Dis* 2002, 8(8):761-767.
- Alkmin, MGA; Landgraf, IM & Melles, CE. A. Avaliação do teste de látex comparativamente à cultura e à imunoeletroforese cruzada no diagnóstico de meningites bacterianas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 1995, 55(1): 19-24.
- Alkmin MGA, Landgraf IM, Vieira MFP. Contribuição da imunoeletroforese cruzada em líquido cefalorraquidiano e/ou soro no diagnóstico de infecções por *Neisseria meningitidis* grupo B no Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 1996, 56 (1): 13-17.
- Arditi M & Yogev R. Common etiologic agents of bacterial meningitidis. In: *The Biologic and Clinical Basis of Infectious Diseases*. Shulman ST, Phair JP, Peterson LR, Warren JR. 5<sup>th</sup> edition, W. B. Saunders Company, Philadelphia, USA, 1997, p. 316-322.
- Artenstein MS, Gold R, Zimmerly JG, Wyle FA, Schneider H, Harkins C. Prevention of meningococcal disease by group C polysaccharide vaccine. *N Engl J Med* 1970, 282: 417–20.
- Bäckman A; Lantz P-G; Radström P, Olcén P. Evaluation of an extended diagnostic PCR assay for detection and verification of the common causes of bacterial meningitis in CSF and other biological fluids. *Mol. Cell Probes* 1999, 13: 49-60,.
- Baethgen LF.; Moraes C; Weidlich L; Rios S; Kmetzsch CI; Silva MSN; Rossetti MLR & Zaha A. Direct-test PCR for detection of meningococcal DNA and its serogroup characterization: standardization and adaptation for use in a public health laboratory. *J. Med. Microbiol* 2003, 52: 793-799.
- Baethgen LF, Weidlich L, Moraes C, Klein C, Nunes LS, Cafrune PI, Lemos AP, Rios SS, Abreu MF, Kmetzsch C, Sperb AF, Riley LW, Rossetti ML, Zaha A. Epidemiology of meningococcal disease in southern Brazil from 1995 to 2003, and molecular characterization of *Neisseria meningitidis* using multilocus sequence typing. *Trop Med Int Health* 2008, 13(1):31-40.
- Balganesh M, Lalitha, MK & Nathaniel R. Rapid diagnosis of acute pyogenic meningitis by a combined PCR dot-blot assay. *Mol Cell Probes* 2000, 14: 61-69.
- Barroso DE, Carvalho DM, Nogueira SA, Solari CA, Xavier-Silva J, Lemos AP, Casagrande ST, Rebelo MC, Soares V. Epidemiology and molecular analysis of epidemic meningococcal disease related to group C *Neisseria meningitidis* in a Brazilian metropolis: Rio de Janeiro 1993-1995. In: Tenth International Pathogenic *Neisseria* Conference, 1996, Baltimore. *Proceedings of the Tenth International Pathogenic Neisseria Conference*. Baltimore: Tenth International Pathogenic *Neisseria* Conference 1996, 10: 435-437.

- Barroso DE. Doença Meningocócica. In: *Medicina Tropical – Abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias*. Batista RS, Gomes AP, Igreja RP, Huggins DW. Ed. Cultura Médica 2000, 21-549.
- Barroso DE, Rebelo MC. Recognition of the epidemiological significance of *Neisseria meningitidis* capsular serogroup W135 in the Rio de Janeiro region, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007, 102(6):773-5.
- Bentley SD, Vernikos GS, Snyder LA, Churcher C, Arrowsmith C, Chillingworth T, Cronin A, Davis PH, Holroyd NE, Jagels K, Maddison M, Moule S, Rabinowitsch E, Sharp S, Unwin L, Whitehead S, Quail MA, Achtman M, Barrell B, Saunders NJ, Parkhill J. Meningococcal genetic variation mechanisms viewed through comparative analysis of serogroup C strain FAM18. *PLoS Genet*. 2007 Feb 16;3(2):e23.
- Bilukha OO, Rosenstein N. Prevention and control of meningococcal disease. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 2005, 54: 1–21.
- Birtles A, Hardy K, Gray SJ, Handford S, Kaczmarek EB, Edwards-Jones V, Fox AJ. Multilocus sequence typing of *Neisseria meningitidis* directly from clinical isolates and clinical specimens and application of the method to the investigation of meningococcal disease case clusters. *J Clin Microbiol* 2005, 43(12):6007-14.
- Bjune G, Høiby EA, Grønnesby JK, Arnesen O, Fredriksen JH, Halstensen A, Holten E, Lindbak AK, Nøkleby H, Rosenqvist E. Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. *Lancet* 1991, 338(8775):1093-6.
- Brehony C, Jolley KA, Maiden MC. Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease. *FEMS Microbiol Rev* 2007, 31(1):15-26.
- Brooks R, Woods CW, Benjamin DK Jr, Rosenstein NE. Increased case-fatality rate associated with outbreaks of *Neisseria meningitidis* infection, compared with sporadic meningococcal disease, in the United States, 1994-2002. *Clin Infect Dis* 2006, 43(1):49-54.
- Bygraves JA & Maiden MC. Analysis of the clonal relationships between strains of *Neisseria meningitidis* by pulsed field gel electrophoresis. *J Gen Microbiol* 1992, 138(3): 523-531.
- Cartwright K, Noah N, Peltola H, Meningococcal Disease Advisory Board. Meningococcal disease in Europe: epidemiology, mortality, and prevention with conjugate vaccines. Report of a European advisory board meeting Vienna, Austria, 6-8 October, 2000. *Vaccine* 2001, 19(31):4347-56.
- Caugant DA. Genetics and evolution of *Neisseria meningitidis*: Importance for the epidemiology of meningococcal disease. *Infect Genet Evol* 2008 Apr 10 [Epub ahead of print].
- Caugant DA. Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *APMIS* 1998, 106(5):505-25.

- Caugant DA, Nicolas P. Molecular surveillance of meningococcal meningitis in Africa. *Vaccine* 2007, 3;25 Suppl 1:A8-11.
- CDC: Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. Centers for Disease Control and Prevention, 1998. ([http://: www.cdc.org](http://www.cdc.org))
- Chiavetta L, Chávez E, Ruzic A, Mollerach M, Regueira M. Surveillance of *Neisseria meningitidis* in Argentina, 1993-2005: distribution of serogroups, serotypes and serosubtypes isolated from invasive disease. *Rev Argent Microbiol* 2007, 39(1):21-27.
- Comanducci M, Bambini S, Brunelli B, Adu-Bobie J, Aricò B, Capecchi B, Giuliani MM, Masignani V, Santini L, Savino S, Granoff DM, Caugant DA, Pizza M, Rappuoli R, Mora M. NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med* 2002, 3;195(11):1445-54.
- Comanducci M, Bambini S, Caugant DA, Mora M, Brunelli B, Capecchi B, Ciocchi L, Rappuoli R, Pizza M. NadA diversity and carriage in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 2004, 72(7):4217-23.
- 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(4): 1553-1558
- de Filippis I, Vicente AC. Multilocus sequence typing and repetitive element-based polymerase chain reaction analysis of *Neisseria meningitidis* isolates in Brazil reveal the emergence of 11 new sequence types genetically related to the ST-32 and ST-41/44 complexes and high prevalence of strains related to hypervirulent lineages. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005, 53(3):161-7.
- de Filippis I, do Nascimento CR, Clementino MB, Sereno AB, Rebelo C, Souza NN, Riley LW. Rapid detection of *Neisseria meningitidis* in cerebrospinal fluid by one-step polymerase chain reaction of the nspA gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005, 51(2):85-90.
- de Filippis I, de Andrade CF, Silva L, Prevots DR, Vicente AC. PorA variable antigenic regions VR1, VR2, and VR3 of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C isolated in Brazil from 1999 to 2004. *Infect Immun* 2007, 75(7):3683-5.
- de Moraes JC, Perkins BA, Camargo MC, Hidalgo NT, Barbosa HA, Sacchi CT, Landgraf IM, Gattas VL, Vasconcelos H de G. Protective efficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in Sao Paulo, Brazil. *Lancet* 1992, 31;340(8827):1074-8.
- de Moraes JC & Barata RB. Meningococcal disease in São Paulo, Brazil, in the 20th century: epidemiological characteristics. *Cad Saude Publica* 2005, 21(5): 1458-1471.

- Dunbar SA, Eason RA, Musher DM, Clarridge JE 3rd. Microscopic examination and broth culture of cerebrospinal fluid in diagnosis of meningitis. *J Clin Microbiol* 1998, 36(6):1617-20.
- Dyet KH & Martin DR. Clonal analysis of the serogroup B meningococci causing New Zealand's epidemic. *Epidemiol Infect* 2006, 134: 377–383.
- Ende A, Schuurman IGAS, Hopman CTP, Fijen CAP, Dankert J. Comparison of commercial diagnostic tests for identification of serogroup antigens of *Neisseria meningitidis*. *J. Clin. Microbiol* 1995, 33(12):3326-3327.
- Espy MJ, Uhl JR, Buckwalter SP, Jones M F, Vetter EA, Yao JDC, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill III FR, Smith TF. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Reviews* 2006, 19(1):165-256.
- Faria SM & Farhat CK. Meningites Bacterianas – diagnóstico e conduta. *Jornal de Pediatria* 1999, 75(1): 46-56.
- Ferreira E, Dias R, Caniça M. Antimicrobial susceptibility, serotype and genotype distribution of meningococci in Portugal, 2001-2002. *Epidemiol Infect* 2006, 134(6):1203-1207.
- Frasch CE, Zollinger WD, Poolman JT. Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. *Rev Infect Dis* 1985, 7(4):504-10.
- Fukasawa LO, Gorla MC, Lemos AP, Schenkman RP, Brandileone MC, Fox JW, Raw I, Frasc CE, Tanizaki MM. Immune response to native NadA from *Neisseria meningitidis* and its expression in clinical isolates in Brazil. *J Med Microbiol* 2003, 52(Pt 2):121-5.
- Girard MP, Preziosi MP, Aguado MT, Kieny MP. A review of vaccine research and development: meningococcal disease. *Vaccine* 2006, 24(22):4692-700.
- Gold R, Lepow ML, Goldschneider I, Draper TL, Gotschlich EC. Clinical evaluation of group A and group C meningococcal polysaccharide vaccines in infants. *J Clin Invest* 1975, 56:1536–47.
- Gotschlich EC, Goldschneider I, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. IV. Immunogenicity of group A and group C meningococcal polysaccharides in human volunteers. *J Exp Med* 1969, 129:1367–84.
- Granoff DM, Moe GR, Giuliani MM, Adu-Bobie J, Santini L, Brunelli B, Piccinetti F, Zuno-Mitchell P, Lee SS, Neri P, Bracci L, Lozzi L, Rappuoli R. A novel mimetic antigen eliciting protective antibody to *Neisseria meningitidis*. *J Immunol* 2001, 167(11):6487-96.
- Gray LD, Fedorko DP. Laboratory diagnosis of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev* 1992 5(2):130-45.

- Gray SJ, Trotter CL, Ramsay ME, Guiver M, Fox AJ, Borrow R, Mallard RH, Kaczmarski EB. Epidemiology of meningococcal disease in England and Wales 1993/94 to 2003/04: contribution and experiences of the Meningococcal Reference Unit. *J Med Microbiol* 2006, 55(Pt 7):887-96.
- Greenwood BM, Bradley AK & Wall RA. Meningococcal disease and season in sub-Saharan Africa. *Lancet* 1985, 2: 829–830.
- Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. PCR “primers” and probes for 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1994, 32(2):335-51.
- Grizot S & Buchanan SK. Structure of the OmpA-like domain of RmpM from *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 2004, 51(4): 1027-1037.
- Guiver M, Borrow R, Marsh J, Gray SJ, Kaczmarski E B, Howells D, Boseley P, Fox AJ. Evaluation of the Applied Biosystems automated Taqman polymerase chain reaction system for the detection of meningococcal DNA. *FEMS Immun. and Med. Microbiol* 2000, 28:173-179.
- Harrison LH. Vaccine prevention of meningococcal disease: making slow progress. *Clin Infect Dis* 2006, 1;43(11):1395-7.
- Havens PL, Garland JS, Brook MM, Dewitz BA, Stremski ES, Troshynski TJ. Trends in mortality in children hospitalized with meningococcal infections, 1957 to 1987. *Pediatr Infect Dis J* 1989, 8:8–11.
- Jacobsson S, Thulin S, Mölling P, Unemo M, Comanducci M, Rappuoli R, Olcén P. Sequence constancies and variations in genes encoding three new meningococcal vaccine candidate antigens. *Vaccine* 2006, 15;24(12):2161-8.
- Janda WM & Knapp JS. *Neisseria* and *Moraxella catarrhalis*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of clinical microbiology*, vol 1. Amer Soc Microbiol, 2003: 585–608.
- Jessouroun E, da Silveira IF, Larangeira AP, Pereira S, Fernandes SA, Rabinovitch L, Frasch CE, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Outer membrane vesicles (OMVs) and detoxified lipooligosaccharide (dLOS) obtained from Brazilian prevalent *N. meningitidis* serogroup B strains protect mice against homologous and heterologous meningococcal infection and septic shock. *Vaccine* 2004, 22(20):2617-25.
- Jódar L, LaForce FM, Ceccarini C, Aguado T, Granoff DM. Meningococcal conjugate vaccine for Africa: a model for development of new vaccines for the poorest countries. *Lancet* 2003, 361(9372):1902-4.
- Jolley KA, Brehony C, Maiden MC. Molecular typing of meningococci: recommendations for target choice and nomenclature. *FEMS Microbiol Rev* 2007, 31(1):89-96.

- Kilic A, Urwin R, Li H, Saracli MA, Stratton CW, Tang YW. Clonal spread of serogroup W135 meningococcal disease in Turkey. *J Clin Microbiol* 2006, 44(1):222-224.
- Kirsch EA, Barton RP, Kitchen L & Giroir BP. Pathophysiology, treatment and outcome of meningococemia: a review and recent experience. *Pediatr Infect Dis J* 1996, 15: 967-978.
- Koerberling O, Welsch JA, Granoff DM. Improved immunogenicity of a H44/76 group B outer membrane vesicle vaccine with over-expressed genome-derived Neisserial antigen 1870. *Vaccine* 2007, 25(10):1912-20.
- Kristiansen BE, Ask E, Jenkins A, Fermer C, Rådström P, Skøld O. Rapid diagnosis of meningococcal meningitis by polymerase chain reaction. *Lancet* 1991, 337:1569-1570.
- Lemos AP. Descrição de um novo clone de *Neisseria meningitidis* sorogrupo C, grande São Paulo, 1990 a 2003. Tese (doutorado): Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, 2005, 119 p.
- Lemos AP, Brandao AP, Gorla MC, Paiva MV, Simonsen V, Melles CE. Phenotypic characterization of *Neisseria meningitidis* strains isolated from invasive disease in Brazil from 1990 to 2001. *J Med Microbiol* 2006, 55(Pt 6): 751-757.
- Lemos AP, Yara TY, Gorla MC, de Paiva MV, de Souza AL, Gonçalves MI, de Almeida SC, do Valle GR, Sacchi CT. Clonal distribution of invasive *Neisseria meningitidis* serogroup C strains circulating from 1976 to 2005 in greater Sao Paulo, Brazil. *J Clin Microbiol*. 2007 Apr;45(4):1266-73.
- Ley BE, Linton CJ, Longhurst S, Jalal H, Millar MR. Eubacterial approach to the diagnosis of bacterial infection. *Arch Dis Child* 1997, 77 (2): 148-149.
- Lu J-J, Perng C-L, Lee S-Y, Wan C-C. Use of PCR with universal “primers” and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol* 2000, 38 (6): 2076-2080.
- MacLennan JM, Shackley F, Heath PT, Deeks JJ, Flamank C, Herbert M, Griffiths H, Hatzmann E, Goilav C, Moxon ER. Safety, immunogenicity, and induction of immunologic memory by a serogroup C meningococcal conjugate vaccine in infants: A randomized controlled trial. *JAMA* 2000, 283(21):2795-801.
- Maiden MC, Suker J, McKenna AJ, Bygraves JA, Feavers IM. Comparison of the class 1 outer membrane proteins of eight serological reference strains of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 1991, 5(3):727-36.
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95(6):3140-5.



- Mantese OC, Hirano J, Santos IC, Silva VM, Castro E. Perfil etiológico das meningites bacterianas em crianças. *J Pediatr* 2002, 78(6): 467-74.
- Masignani V, Comanducci M, Giuliani MM, Bambini S, Adu-Bobie J, Arico B, Brunelli B, Pieri A, Santini L, Savino S, Serruto D, Litt D, Kroll S, Welsch JA, Granoff DM, Rappuoli R, Pizza M. Vaccination against *Neisseria meningitidis* using three variants of the lipoprotein GNA1870. *J Exp Med* 2003, 197(6):789-99.
- Mayer LW, Reeves MW, Al-Hamdan N, Sacchi CT, Taha MK, Ajello GW, Schmink SE, Noble CA, Tondella ML, Whitney AM, Al-Mazrou Y, Al-Jefri M, Mishkhis A, Sabban S, Caugant DA, Lingappa J, Rosenstein NE, Popovic T. Outbreak of W135 meningococcal disease in 2000: not emergence of a new W135 strain but clonal expansion within the electrophoretic type-37 complex. *J Infect Dis* 2002, 185(11):1596-1605.
- McEllistrem MC, Kolano JA, Pass MA, Caugant DA, Mendelsohn AB, Fonseca Pacheco AG, Shutt KA, Razeq J, Harrison LH; Maryland Emerging Infections Program. Correlating epidemiologic trends with the genotypes causing meningococcal disease, Maryland. *Emerg Infect Dis* 2004, 10(3):451-456.
- Mothershed EA, Sacchi CT, Whitney AM, Barnett GA, Ajello GW, Schmink S, Mayer LW, Phelan M, Taylor TH Jr, Bernhardt SA, Rosenstein NE, Popovic T. Use of real-time PCR to resolve discrepancies in serogroup identification of *Neisseria meningitidis*. *J. Clin. Microbiol* 2004, 42 (1):320-328.
- Mothershed EA, Whitney AM. Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: present and future considerations for the clinical laboratory. *Clin Chim Acta* 2006, 363(1-2):206-20.
- Ni H, Knight AI, Cartwright K, Palmer WH, Mc Fadden J. Polymerase chain reaction for diagnosis of meningococcal meningitis. *Lancet* 1992, 340:1432-1434.
- Olyhoek T, Crowe BA, Achtman M. Clonal population structure of *Neisseria meningitidis* serogroup A isolated from epidemics and pandemics between 1915 and 1983. *Rev Infect Dis* 1987, 9(4):665-692.
- Parkhill J, Achtman M, James KD, Bentley SD, Churcher C, Klee SR, Morelli G, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Davies RM, Davis P, Devlin K, Feltwell T, Hamlin N, Holroyd S, Jagels K, Leather S, Moule S, Mungall K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Simmonds M, Skelton J, Whitehead S, Spratt BG, Barrell BG. Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491. *Nature* 2000, 404(6777):502-6.
- Perkins MD, Mirrett S, Reller LB. Rapid bacterial antigen detection is not clinically useful. *J. Clin. Microbiol* 1995, 33(6):1486-1491.
- Perrett KP, Pollard AJ. Towards an improved serogroup B *Neisseria meningitidis* vaccine. *Expert Opin Biol Ther* 2005, 5(12):1611-25.

- Phillips EJ, Simor AE. Bacterial meningitis in children and adults. Changes in community-acquired disease may affect patient care. *Postgrad Med* 1998, 103(3):102-117.
- Pizza M, Scarlato V, Masignani V, Giuliani MM, Aricò B, Comanducci M, Jennings GT, Baldi L, Bartolini E, Capecchi B, Galeotti CL, Luzzi E, Manetti R, Marchetti E, Mora M, Nuti S, Ratti G, Santini L, Savino S, Scarselli M, Storni E, Zuo P, Broeker M, Hundt E, Knapp B, Blair E, Mason T, Tettelin H, Hood DW, Jeffries AC, Saunders NJ, Granoff DM, Venter JC, Moxon ER, Grandi G, Rappuoli R. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science* 2000, 287(5459):1816-20.
- Plant L, Sundqvist J, Zughaier S, Lövkvist L, Stephens DS, Jonsson AB. Lipooligosaccharide structure contributes to multiple steps in the virulence of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 2006, 74(2):1360-7.
- Plested JS, Granoff DM. Vaccine-induced opsonophagocytic immunity to *Neisseria meningitidis* group B. *Clin Vaccine Immunol* 2008, 15(5):799-804.
- Popovic T, Schmink S, Rosenstein NA, Ajello GW, Reeves MW, Plikaytis B, Hunter SB, Ribot EM, Boxrud D, Tondella ML, Kim C, Noble C, Mothershed E, Besser J, Perkins BA. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological investigations of meningococcal disease outbreaks caused by *Neisseria meningitidis* serogroup C. *J Clin Microbiol* 2001, 39(1): 75-85.
- Puricelli RC, Kupek E, Westrupp MH. Three decades of meningococcal disease in the state of Santa Catarina, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2004, 8(3):241-248.
- Radström P, Bäckman A, Qian N, Kragstjerg P, Palson C, Olcén P. Detection of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by an assay for simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococci* using a seminested PCR strategy. *J. Clin. Microbiol.*, 32 (11): 2738-2744, 1994.
- Raskin S, Philips III JA, Kaplan G, McClure M, Vnencak-Jones C. Cystic fibrosis genotyping by direct PCR analysis of Guthrie blood spots. *PCR Methods and Applications* 1992, 2:154-156.
- Requejo HIZ & Ferreira AW. Diagnóstico rápido de meningites bacterianas pelo teste de látex aglutinação. *Laes/Haes* 1993, 81: 32-40.
- Richardson DC, Louie L, Louie M, Simor AE. Evaluation of a rapid PCR assay for diagnosis of meningococcal meningitis. *J Clin Microbiol* 2003, 41(8):3851-3.
- Rigatti, MFB. Análise do comportamento da doença meningocócica em Porto Alegre – 2000. *Boletim Epidemiológico* 2000, ano III (8):4-5.
- Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM. Meningococcal disease. *N Engl J Med* 2001, 344(18):1378-88.

- Rossetti MLR, Jardim SB, Rodrigues VFS, Moura AR, Oliveira H, Zaha A. Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix. *J. Microbiol. Methods* 1997, 28: 139-146.
- Russell JE, Jolley KA, Feavers IM, Maiden MC, Suker J. PorA variable regions of *Neisseria meningitidis*. *Emerg Infect Dis* 2004, 10(4):674-8.
- Sacchi CT, Pessoa LL, Ramos SR, Milagres LG, Camargo MC, Hidalgo NT, Melles CE, Caugant DA, Frasch CE. Ongoing group B *Neisseria meningitidis* epidemic in Sao Paulo, Brazil, due to increased prevalence of a single clone of the ET-5 complex. *J Clin Microbiol* 1992, 30(7): 1734-1738.
- Sacchi CT, Tondella ML, Gorla MC, de Lemos PS, Melles CE, de Paiva MV, Rodrigues DS, Andrade AJ, Ribeiro MO, Sperb A. Genetic structure of *Neisseria meningitidis* serogroup C epidemic strains in south Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1995, 37(4): 281-289.
- Sacchi CT, Lemos AP, Popovic T, De Moraes JC, Whitney AM, Melles CE, Brondi LM, Monteiro LM, Paiva MV, Solari CA, Mayer LW. Serosubtypes and PorA types of *Neisseria meningitidis* serogroup B isolated in Brazil during 1997-1998: overview and implications for vaccine development. *J Clin Microbiol* 2001, 39(8):2897-903.
- Sáfadi MA, Barros AP. Meningococcal conjugate vaccines: efficacy and new combinations. *J Pediatr (Rio J)* 2006, 82(3 Suppl):S35-44.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985, 230:1350-4.
- Schoen C, Joseph B, Claus H, Vogel U, Frosch M. Living in a changing environment: insights into host adaptation in *Neisseria meningitidis* from comparative genomics. *Int J Med Microbiol*. 2007, 297(7-8):601-13.
- Schoen C, Blom J, Claus H, Schramm-Glück A, Brandt P, Müller T, Goesmann A, Joseph B, Konietzny S, Kurzai O, Schmitt C, Friedrich T, Linke B, Vogel U, Frosch M. Whole-genome comparison of disease and carriage strains provides insights into virulence evolution in *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105(9):3473-8.
- Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol* 1986, 51(5):873-84.
- Sierra GV, Campa HC, Varcacel NM, Garcia IL, Izquierdo PL, Sotolongo PF, Casanueva GV, Rico CO, Rodriguez CR, Terry MH. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann* 1991, 14(2):195-207.
- Snape MD, Pollard AJ. Meningococcal polysaccharide-protein conjugate vaccines. *Lancet Infect Dis* 2005, 5(1):21-30.

- Stephens DS. Uncloaking the meningococcus: dynamics of carriage and disease, *Lancet* 1999, 353, 941–942.
- Stephens DS. Conquering the meningococcus. *FEMS Microbiol Rev.* 2007, 31(1):3-14.
- Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. *Lancet* 2007, 369(9580):2196-210.
- Taha MK. Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 2000a, 38:855– 7.
- Taha MK, Achtman M, Alonso JM, Greenwood B, Ramsay M, Fox A, Gray S, Kaczmarek E. Serogroup W135 meningococcal disease in Hajj pilgrims. *Lancet* 2000b, 356(9248):2159.
- Taha MK. Molecular detection and characterization of *Neisseria meningitidis*. *Expert Rev Mol Diagn* 2002, 2(2):143-150.
- Takahashi H, Kuroki T, Watanabe Y, Tanaka H, Inouye H, Yamai S, Watanabe H. Characterization of *Neisseria meningitidis* isolates collected from 1974 to 2003 in Japan by multilocus sequence typing. *J Med Microbiol* 2004, 53(Pt 7):657-62.
- Tappero JW, Lagos R, Ballesteros AM, Plikaytis B, Williams D, Dykes J, Gheesling LL, Carlone GM, Høiby EA, Holst J, Nøkleby H, Rosenqvist E, Sierra G, Campa C, Sotolongo F, Vega J, Garcia J, Herrera P, Poolman JT, Perkins BA. Immunogenicity of 2 serogroup B outer-membrane protein meningococcal vaccines: a randomized controlled trial in Chile. *JAMA* 1999, 281(16):1520-7.
- Tettelin H, Saunders NJ, Heidelberg J, Jeffries AC, Nelson KE, Eisen JA, Ketchum KA, Hood DW, Peden JF, Dodson RJ, Nelson WC, Gwinn ML, DeBoy R, Peterson JD, Hickey EK, Haft DH, Salzberg SL, White O, Fleischmann RD, Dougherty BA, Mason T, Ciecko A, Parksey DS, Blair E, Cittone H, Clark EB, Cotton MD, Utterback TR, Khouri H, Qin H, Vamathevan J, Gill J, Scarlato V, Masignani V, Pizza M, Grandi G, Sun L, Smith HO, Fraser CM, Moxon ER, Rappuoli R, Venter JC. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science* 2000, 287(5459):1809-15.
- Thompson EA, Feavers IM, Maiden MC. Antigenic diversity of meningococcal enterobactin receptor FetA, a vaccine component. *Microbiology* 2003, 149(Pt 7):1849-58.
- Traoré Y, Njanpop-Lafourcade BM, Adjogble KL, Lourd M, Yaro S, Nacro B, Drabo A, Parent du Châtelet I, Mueller JE, Taha MK, Borrow R, Nicolas P, Alonso JM, Gessner BD. The rise and fall of epidemic *Neisseria meningitidis* serogroup W135 meningitis in Burkina Faso, 2002-2005. *Clin Infect Dis* 2006, 43(7):817-22.
- Tsai CM, Frasch CE, Mocca LF. Five structural classes of major outer membrane proteins in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* 1981, 146(1):69-78

- Tunkel AR, Sheld WM. Acute meningitis. *In: Principles and practice of infectious diseases* Mandell GL, Benett, JE, Dolin R, eds., 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 1995: 831-65.
- Tzeng Y-L. & Stephens DS. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. *Microb Infect* 2000, 2: 687-700.
- Urwin R, Maiden MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol* 2003, 11(10):479-87.
- van der Ley P, Heckels JE, Virji M, Hoogerhout P, Poolman JT. Topology of outer membrane porins in pathogenic *Neisseria* spp. *Infect Immun* 1991, 59(9):2963-71.
- van Deuren M, Brandtzaeg P, van der Meer JW. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin Microbiol Rev* 2000, 13(1):144-66.
- Vogel U, Frosch M. Mechanisms of neisserial serum resistance. *Mol Microbiol* 1999, 32(6):1133-9.
- Volk WA, Gehardt BM, Hammarskjöld M-L, Kadner RJ. *Neisseriaceae*. *In: Essentials of Medical Microbiology*. 5<sup>th</sup> edition, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996, p. 348-352.
- WHO. World Health Organization *Control of epidemic meningococcal disease*. WHO practical guidelines. 2<sup>nd</sup> edition, World Health Organization, 1998. ([http://: www.who.int/emc-documents/meningitis/whoemcbac983.html](http://www.who.int/emc-documents/meningitis/whoemcbac983.html)).
- Wong S, Lennon D, Jackson C, Stewart J, Reid S, Crengle S, Tilman S, Aaberge I, O'Hallahan J, Oster P, Mulholland K, Martin D. New zealand epidemic strain meningococcal B outer membrane vesicle vaccine in children aged 16-24 months. *Pediatr Infect Dis J* 2007, 26(4):345-50.
- Zhang X, Shao Z, Zhu Y, Xu L, Xu X, Mayer LW, Xu J, Jin Q. Genetic characteristics of serogroup A meningococci circulating in China, 1956-2005. *Clin Microbiol Infect* 2008, 14(6):555-61.

## **ANEXOS**

## ANEXO I

### Lista de Figuras

Figura 1. Corte transversal da membrana celular do meningococo.....6

### Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição química da cápsula polissacarídica dos sorogrupos patogênicos de *Neisseria meningitidis*.....7

Tabela 2. Características do LCE em meningites bacterianas.....10

## **ANEXO 2**

Outros resultados obtidos durante o Estágio de Doutorando no Exterior, realizado no “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC), Atlanta, Estados Unidos.

Artigo publicado pelo periódico Journal of Clinical Microbiology:

### **Evaluation and Improvement of Real-Time PCR Assays Targeting**

### ***lytA*, *ply*, and *psaA* Genes for Detection of Pneumococcal DNA**

J Clin Microbiol. 2007 Aug;45(8):2460-6

doi:10.1128/JCM.02498-06



## Evaluation and Improvement of Real-Time PCR Assays Targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* Genes for Detection of Pneumococcal DNA<sup>∇</sup>

Maria da Gloria S. Carvalho,<sup>1</sup> Maria Lucia Tondella,<sup>1</sup> Karen McCaustland,<sup>2</sup> Luciana Weidlich,<sup>3</sup> Lesley McGee,<sup>4</sup> Leonard W. Mayer,<sup>1</sup> Arnold Steigerwalt,<sup>1</sup> Melissa Whaley,<sup>1</sup> Richard R. Facklam,<sup>1</sup> Barry Fields,<sup>1</sup> George Carlone,<sup>1</sup> Edwin W. Ades,<sup>1</sup> Ron Dagan,<sup>5</sup> and Jacquelyn S. Sampson<sup>1\*</sup>

Division of Bacterial Diseases<sup>1</sup> and Division of Scientific Resources,<sup>2</sup> Centers for Disease Control and Prevention, and Hubert Department of Global Health, Emory University,<sup>4</sup> Atlanta, Georgia; Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Porto Alegre, Brazil<sup>3</sup>; and Pediatric Infectious Diseases Unit, Soroka University Medical Center, Beer Sheva, Israel<sup>5</sup>

Received 13 December 2006/Returned for modification 20 March 2007/Accepted 22 May 2007

The accurate diagnosis of pneumococcal disease has frequently been hampered not only by the difficulties in obtaining isolates of the organism from patient specimens but also by the misidentification of pneumococcus-like viridans group streptococci (P-LVS) as *Streptococcus pneumoniae*. This is especially critical when the specimen comes from the respiratory tract. In this study, three novel real-time PCR assays designed for the detection of specific sequence regions of the *lytA*, *ply*, and *psaA* genes were developed (*lytA*-CDC, *ply*-CDC, and *psaA*, respectively). These assays showed high sensitivity (<10 copies for *lytA*-CDC and *ply*-CDC and an approximately twofold less sensitivity for *psaA*). Two additional real-time PCR assays for *lytA* and *ply* described previously for pneumococcal DNA detection were also evaluated. A panel of isolates consisting of 67 *S. pneumoniae* isolates (44 different serotypes and 3 nonencapsulated *S. pneumoniae* isolates from conjunctivitis outbreaks) and 104 nonpneumococcal isolates was used. The 67 *S. pneumoniae* isolates were reactive in all five assays. The new real-time detection assays targeting the *lytA* and *psaA* genes were the most specific for the detection of isolates confirmed to be *S. pneumoniae*, with *lytA*-CDC showing the greatest specificity. Both *ply* PCRs were positive for all isolates of *S. pseudopneumoniae*, along with 13 other isolates of other P-LVS isolates confirmed to be non-*S. pneumoniae* by DNA-DNA reassociation. Thus, the use of the *ply* gene for the detection of pneumococci can lead to false-positive reactions in the presence of P-LVS. The five assays were applied to 15 culture-positive cerebrospinal fluid specimens with 100% sensitivity; and serum and ear fluid specimens were also evaluated. Both the *lytA*-CDC and *psaA* assays, particularly the *lytA*-CDC assay, have improved specificities compared with those of currently available assays and should therefore be considered the assays of choice for the detection of pneumococcal DNA, particularly when upper respiratory P-LVS might be present in the clinical specimen.

*Streptococcus pneumoniae* continues to be a serious etiologic agent of disease throughout the world, causing a range of illnesses which include otitis media, sinusitis, pneumonia, bacteremia, and meningitis (1, 6). The limitations of culture-based, conventional tests for the detection of *S. pneumoniae* make the establishment of a definitive diagnosis difficult. Isolation of *S. pneumoniae* from blood, the recognized “gold standard,” occurs in only 20 to 30% of adult cases of pneumococcal pneumonia and less than 10% of cases among children (18, 24), and serologic assays for both antibody and antigen detection lack specificity and sensitivity (16, 30). Although the recently introduced Binax NOW urine antigen test has been shown to be sensitive and specific for the detection of the organism in adults in some studies (22, 23), it is unable to distinguish between carriage and disease in children (11). Compounding this problem, the misidentification of pneumococcus-like viridans group streptococci (P-LVS) as *S. pneumoniae* presents additional opportunities for the misidentification of

the causative agents of infections (3), especially when identification is attempted with specimens from nonsterile sites, such as sputum. The identification of *S. pneumoniae* has classically been based on bile solubility, optochin sensitivity, and the GenProbe AccuProbe Pneumococcus identification test (14); but increasingly, there have been reports in the literature of the isolation of P-LVS from clinical specimens, which may give positive or variable reactions by one or more of these standard tests for the detection of pneumococci (3). Moreover, among a subset of reported isolates of P-LVS, a newly recognized species classified as *Streptococcus pseudopneumoniae* has been described and characterized (3). *S. pseudopneumoniae* organisms are bile solubility negative and are resistant to optochin in the presence of 5% CO<sub>2</sub>, but they are AccuProbe assay positive (3). The appearance of these pneumococcus-like organisms has complicated identification and diagnosis even further, especially when specimens from nonsterile respiratory sites are used for organism identification. Therefore, special care must be taken to monitor and correctly identify isolates confirmed to be pneumococci in the clinical setting, and assays in development will need to include *S. pseudopneumoniae* and other P-LVS in specificity determinations for a more precise diagnosis. Previous studies in our laboratories have shown that DNA-DNA hybridization or the PCR assay based on the au-

\* Corresponding author. Mailing address: Centers for Diseases Control and Prevention, 1600 Clifton Road, Mail Stop G05, Atlanta, GA 30333. Phone: (404) 639-3862. Fax: (404) 639-4043. E-mail: JSampson@CDC.gov.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 30 May 2007.

tolysin (*lytA*) and pneumococcal surface adhesion (*psaA*) gene sequences can reliably distinguish *S. pneumoniae* from *S. pseudopneumoniae* (21). In a recent publication by Llull et al. (19), *lytA* sequences from *S. pneumoniae* and *S. pseudopneumoniae* were carefully analyzed and pneumococcus-specific alleles were identified. For the differentiation of isolates confirmed to be pneumococci, they developed a standard PCR based on these sequences, followed by an enzyme digestion step. Although these techniques are very suitable for organism identification, they may not be the most ideal for rapid diagnostics. The development of simple, sensitive, rapid, and more accurate assays for the detection of *S. pneumoniae* has been encouraged and is of the utmost importance in making exact estimates of disease burden, tracking changes in the epidemiology of *S. pneumoniae* disease, and evaluating the effectiveness of currently used vaccines.

To this end, researchers are exploring the use of newer nucleic acid-based techniques such as real-time PCR to improve pneumococcal disease diagnosis. The advantages of real-time PCR over conventional assays are its speed; elimination of the need for postprocessing steps which could contribute to contamination; and its wider dynamic range, which allows detection over much larger variations in concentrations of the target. The most important advantage is the lower limit of detection. Thus, the real-time PCR technology shows great sensitivity and is the only means of detection of some of the respiratory viruses (5, 32). Real-time PCR assays for *S. pneumoniae* have been reported in the literature (8, 15, 16, 20, 26, 29). These assays, mostly based on amplification of the *lytA* and *ply* genes, are not in routine use but have been used in research studies for the detection of pneumococcal DNA and for evaluation of their suitability when they are used with different clinical specimen types (2, 8, 20, 23, 26–29, 33). In this study, we have developed three new real-time PCR assays for the detection of specific sequence regions of the pneumococcal *psaA*, *lytA*, and *ply* genes. These newly developed *lytA* and *ply* assays use primer/probe sequences different from those used in assays described previously. We have taken advantage of the extensive strain collection of the CDC *Streptococcus* Laboratory to thoroughly evaluate these new PCRs with a stringent specificity panel.

An adequate, extensive, and simultaneous evaluation of the published real-time PCRs performed with the same samples to ascertain the comparative sensitivities and specificities of the assays has not been done to date. Therefore, it is unclear if the use of one assay is more advantageous than the use of another or if they have equal sensitivities and specificities. In this study, the three newly developed assays were compared to two previously published assays, the *ply* assay developed by Corless et al. (8) and the *lytA* assay developed by McAvin et al. (20), to determine relative sensitivities and specificities. These assays were chosen because they were performed in-house in our laboratories. One goal of this study was to thoroughly evaluate the performance of these assays as well as those of the new assays by using the same set of isolates and clinical specimens to assess their relative usefulness. We also wanted to demonstrate that it is possible, with the use of and access to an existing strain collection, to design a highly specific real-time assay for *S. pneumoniae* which would not require additional postprocessing steps.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial isolates.** The panel consisted of 67 strains representing 44 different serotypes of *S. pneumoniae* (serotypes 1, 2, 4, 5, 6A, 6B, 7B, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 15A, 15C, 16F, 17A, 17F, 18B, 18C, 18F, 19A, 19C, 19F, 20, 21, 22A, 22F, 23B, 23F, 24A, 24B, 28A, 28F, 32F, 33A, 33F, 35A, 35F, and 40 and 3 nonencapsulated strains from conjunctivitis outbreaks) and 104 nonpneumococcal isolates, including *S. pseudopneumoniae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus peroris*, *Streptococcus infantis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus australis*, *Streptococcus sinensis*, *Streptococcus oligofermentans*, *Streptococcus intestinalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus equi* subsp. *equi*, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Streptococcus porcinus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus intermedius*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus warneri*, 13 viridans group streptococci not identified to the species level, *Dolosigranulum pigrum*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Haemophilus influenzae* types a to f and nontypeable, *Haemophilus parainfluenzae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Nocardia farcinica*, *Nocardia asteroides*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella pertussis*, and *Bordetella bronchiseptica*. *S. pneumoniae* ATCC strain 33400 was used as a positive control in all assays. All bacterial isolates were obtained from the culture collections of CDC laboratories (*Streptococcus* Laboratory, Respiratory Diseases Branch and Meningitis Laboratory, Meningitis and Vaccine Preventable Diseases Branch).

**OPT.** The optochin susceptibility test (OPT) was performed on 5% sheep blood agar plates in 5% CO<sub>2</sub> environments, as described by Arbique et al. (3).

**BS test.** The tube bile solubility (BS) test was performed as described previously (3, 25).

**DNA probe hybridization test.** The AccuProbe *Streptococcus pneumoniae* culture identification test, based on the rRNA gene sequence, was performed according to the manufacturer's instructions (Gen-Probe, San Diego, CA).

**DNA-DNA reassociation.** Growth, harvesting, and lysis of the bacterial cells were performed as described previously (3, 7). Extraction and purification of DNA and DNA-DNA reassociation studies, including determination of DNA relatedness by the hydroxyapatite hybridization method, were performed as described by Brenner and colleagues (7). DNA hybridization experiments were performed at 55°C for optimal DNA reassociation and at the stringent DNA reassociation temperature of 70°C. The levels of divergence within related sequences were determined by assuming that each degree of heteroduplex instability was caused by 1% unpaired bases. Divergence, expressed by the change in melting temperature, is the decrease in the thermal stability (in degrees Celsius) of the heterologous DNA duplex relative to that of the homologous duplexes. Divergence was calculated to the nearest 0.5%.

**Clinical specimens.** Clinical specimens consisted of serum, middle ear fluids (MEFs), and cerebrospinal fluids (CSFs) and were obtained in accordance with CDC Institutional Review Board stipulations. The sera and MEFs were obtained from the Soroka University Hospital in Beer-Sheva, Israel. Serum specimens were collected from 15 patients with pneumococcal bacteremia and 15 age-matched, ethnic group-matched, healthy control children for whom nasopharyngeal swab cultures were negative for *S. pneumoniae*. MEF specimens consisted of 10 *S. pneumoniae* culture-positive MEF specimens and 10 *S. pneumoniae* culture-negative but *H. influenzae*-positive MEF specimens. Twenty-five CSF specimens were obtained from the Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, and consisted of 15 specimens from meningitis patients who were pneumococcal culture positive and 10 CSF specimens from pneumococcus-negative, *Neisseria meningitidis*-positive patients. The specimens were shipped on dry ice and were frozen at -70°C upon arrival.

**DNA extraction for real-time PCR analysis.** DNA was extracted from the isolates by a modification of the QIAGEN DNA Mini kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA) method. Briefly, a loopful of the overnight growth from a blood agar plate was resuspended in lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.0 mM EDTA, 1.2% Triton X-100) containing 0.04 g/ml lysozyme and 75 U/ml of mutanolysin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and incubated for 1 h at 37°C in a water bath. The remaining procedures followed the manufacturer's instructions.

For clinical specimens, 200 µl of clinical material was added to 100 µl of TE (Tris-EDTA) buffer containing 0.04 g/ml lysozyme and 75 U/ml of mutanolysin (Sigma Chemical Co.), and the mixture was incubated for 1 h in a 37°C water bath. All subsequent steps were as outlined in the QIAGEN DNA Mini protocol



TABLE 1. Real-time PCR primers and probes<sup>d</sup>

Oligonucleotide	Sequence	Nucleotide position	GenBank accession no.
<i>lytA</i> -CDC forward	5'-ACGCAATCTAGCAGATGAAGCA-3'	1841014	AE005672
<i>lytA</i> -CDC reverse	5'-TCGTGCGTTTTAATTCAGCT-3'	1840961	
<i>lytA</i> -CDC probe	5'-FAM-GCCGAAAACGCTTGATACAGGGAG-3'-BHQ1	1840985	
<i>psaA</i> forward	5'-GCCCTAATAAATTGGAGGATCTAATGA-3'	166	U53509
<i>psaA</i> reverse	5'-GACCAGAAGTTGATCTTTTTTCCG-3'	279	
<i>psaA</i> probe <sup>a,b</sup>	5'-HEX-CTAGCACATGCTACAAGAATGATTGCAGAAA GAAA-3'-phosphate	219	
<i>ply</i> -CDC forward	5'-GCTTATGGGCGCCAAGTCTA-3'	721	AE008539
<i>ply</i> -CDC reverse	5'-CAAAGCTTCAAAGCAGCCTC TA-3'	798	
<i>ply</i> -CDC probe <sup>b,c</sup>	5'-FAM-CTCAAGTTGGAACCACGAGTAAGAGTGAT GAA-3'-phosphate	742	

<sup>a</sup> The *psaA* probe is designed to bind to the reverse strand of the amplicon.

<sup>b</sup> T, the thymidine on which the internal BHQ quencher was attached.

<sup>c</sup> For multiplex detection the 5' end label was changed to CAL Flour 610.

<sup>d</sup> After this study was completed a modification to the probe for the *lytA*-CDC assay by the addition of a T residue (in boldface) to the 5' end, which yielded the probe sequence 5'-FAM-TGCCGAAAACGCTTGATACAGGGAG-3'-BHQ1, was shown to improve the intensity of the signal but not change the LLD with purified DNA or the sensitivity or specificity with DNA from isolates. Unfortunately, the supply of the clinical specimens used in the study and the DNA from them was depleted, so we were unable to completely evaluate the new probe. All our preliminary experiments with this new probe suggest that it performs as well as the original probe. We recommend its use and have begun a complete evaluation and validation study.

booklet. DNA was eluted in 100  $\mu$ l of QIAGEN elution buffer and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The concentrations of the DNA extracted from the bacterial cultures were determined by the Nanodrop method (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE).

**Real-time PCRs for *lytA*, *ply*, and *psaA*.** The two previously published real-time PCR assays were performed as described previously (8, 20). For development of the new assays, oligonucleotide primers and fluorescent dye-labeled probes were designed on the basis of the previously published *lytA*, *ply*, and *psaA* gene sequences and the sequences available in GenBank by using Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA). The probes were labeled at the 5' end with either 6-carboxyfluorescein (FAM) or, in the case of the *psaA* probe, hexachloro-6-carboxyfluorescein (HEX). Black hole quencher 1 (BHQ1; Bioscience Technologies, Novato, CA) was placed either at the 3' end of the probe or internally on a thymidine (Table 1). If the sequence was internally quenched, the 3' end was capped with a phosphate group to prevent extension of the probe. The primer and probe sequences are listed in Table 1. The assays were carried out in a final 25- $\mu$ l reaction volume and were performed by use of the TaqMan Universal Master Mix kit (Applied Biosystems), according to the instructions of the manufacturer, with 2.5  $\mu$ l of sample DNA. The primer and probe concentrations for each of the three assays were optimized; and in accordance with the experimentally optimized concentrations, 500, 200, and 200 nM *psaA*-, *lytA*-, and *ply*-specific primers, respectively, and 100, 200, and 200 nM *psaA*-, *lytA*-, and *ply*-specific probes, respectively, were used for all subsequent experiments. A no-template control and an *S. pneumoniae*-positive DNA control (*S. pneumoniae* ATCC 33400) were included in every run. DNA was amplified with the Mx3000P system (Stratagene, La Jolla, CA) or the 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems) by using the following cycling parameters: 95 $^{\circ}\text{C}$  for 10 min, followed by 40 cycles of 95 $^{\circ}\text{C}$  for 15 s and 60 $^{\circ}\text{C}$  for 1 min. Amplification data were analyzed by instrument software (Stratagene or Applied Biosystems). Negative samples were defined as those with cycle threshold ( $C_T$ ) values greater than >40. The new assays are designated *lytA*-CDC, *ply*-CDC, and *psaA*.

**Analytical sensitivity and specificity determinations of real-time PCRs.** For assessments of the lower limits of detection (LLDs), serial 10-fold dilutions (equivalent to from 6,666 to 6.6 copies) of purified DNA from pneumococcal reference strain ATCC 33400 were prepared, and aliquots were tested by all five real-time PCR protocols. Specificity determinations were made by testing at 5 ng/ $\mu$ l the DNAs extracted from 67 *S. pneumoniae* isolates and 104 nonpneumococcal isolates (listed above) by all five assays.

**Real-time PCR of clinical samples.** The detection of *S. pneumoniae* DNA in the serum, MEF, and CSF specimens was performed in parallel with aliquots of the same specimen for all assays. DNA extracted (2.5  $\mu$ l of undiluted DNA or 2.5  $\mu$ l of a 1:3 dilution) from serum, MEF, or CSF specimens was used in the amplification reactions. All assays with each clinical sample were performed in triplicate. A specimen was considered positive if two of the three triplicates gave a positive result within the <40-cycle cutoff. The assay protocols were as de-

scribed above. A control reaction with RNase P human gene was performed independently with each sample to check for the presence of inhibitors (13). A failure to get amplification in this reaction was considered indicative of the presence of inhibitors.

**Multiplex *psaA*, *lytA*-CDC, and *ply*-CDC real-time PCRs.** The three sets of primers and probes were combined into a single reaction mixture for multiplex detection. Modifications to the single-gene detection assays included the use of QIAGEN's QuantiTect Multiplex PCR NoROX master mixture, changing of the *ply* gene probe fluorescent label from FAM to CAL Flour Red 610 at the 5' end and BHQ2 (both from Bioscience Technologies) at the 3' end, and reduction of the concentration of the *lytA* FAM probe to 100 nM from the original 200 nM. The temperatures and the numbers of cycles remained the same as described above for the original single-PCR protocols.

## RESULTS

**LLDs of assays for *S. pneumoniae* detection.** The analytical LLDs for all five assays were measured by amplifying serial dilutions of purified extracted genomic DNA from positive control strain *S. pneumoniae* ATCC 33400. All five assays showed high sensitivities with their respective primer pairs and probes, with a limit of detection equivalent to <10 copies for all PCRs except the *psaA* PCR, which was approximately two-fold less sensitive. All standard curves generated had slopes of  $-3.4$  to  $-3.2$ , with the  $R^2$  value being >0.96. The efficiencies of the assays were very similar and ranged from 96% to 100%. Evaluation of the five assays for their abilities to amplify DNA from a panel of 67 *S. pneumoniae* strains representing 45 serotypes and nontypeable *S. pneumoniae* strains resulted in 100% amplification or the detection of DNA from all *S. pneumoniae* strains tested.

**Specificities of assays for *S. pneumoniae* detection.** The analytical specificity of each of the five assays was evaluated and the specificities were compared by amplifying DNA extracted from 104 strains of nonpneumococcal bacteria. These strains represented several genera of gram-positive and gram-negative bacteria, some of which inhabit the oral cavity. No amplification occurred with any of the nonstreptococci in the specificity panel. There was, however, amplification with some strains of

TABLE 2. DNA-DNA hybridization and real-time PCR for unidentified viridans streptococci and *Streptococcus pseudopneumoniae*<sup>a</sup>

Strain	Geographic origin	Specimen	Identification test result			No. of <i>S. pneumoniae</i> ATCC 33400 <sup>T</sup> /no. of <i>S. pseudopneumoniae</i> ATCC BAA 960 <sup>T</sup> reference strains whose DNA was labeled			Real-time PCR result				
			OPT	BS test	GP	RBR at 55°C	RBR at 70°C	D	<i>psaA</i>	<i>lytA</i>	<i>lytA</i> -CDC	<i>ply</i>	<i>ply</i> -CDC
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 33400 <sup>T</sup>			S	+	+	100/55	100/28	0.0/3.5	+	+	+	+	+
Unidentified viridans streptococci													
868-84	MD	Blood	R	-	-	66/ND	59/ND	4.5/ND	-	-	-	+	+
2901-90	AL	Throat	R	+	-	65/ND	51/ND	6.0/ND	-	-	-	+	+
2904-90	AL	Throat	S	+	-	61/ND	49/ND	5.5/ND	-	-	-	+	-
2909-90	AL	Throat	R	-	-	61/ND	46/ND	6.0/ND	-	-	-	+	+
2913-90	AL	Throat	S	-	-	65/52	58/44	4.5/4.5	-	-	-	+	+
2916-90	AL	Throat	R	-	-	58/ND	42/ND	6.0/ND	-	-	-	+	+
2918-90	AL	Throat	S	+	-	63/ND	54/ND	6.0/ND	-	-	-	+	+
2919-90	AL	Throat	R	-	-	63/ND	54/ND	4.5/ND	-	-	-	+	-
2920-90	AL	Throat	S	+	-	62/ND	53/ND	6.5/ND	-	-	-	+	+
2921-90	AL	Throat	R	-	-	62/ND	58/ND	4.5/ND	-	-	-	+	-
2939-90	AL	Throat	R	-	-	66/ND	57/ND	4.0/ND	-	-	-	+	+
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>													
ATCC BAA-960 <sup>T</sup>	NS-CA	Sputum	R	-	+	62/100	56/100	4.0/0.0	-	-	-	+	+
253-03	NS-CA	Sputum	R	-	+	70/84	60/74	4.0/2.0	-	-	-	+	+
276-03	NS-CA	Sputum	R	-	+	68/83	53/77	4.0/1.0	-	-	-	+	+
288-03	NS-CA	Sputum	R	-	+	70/82	57/50	4.0/0.5	+	+	-	+	+
290-03	NS-CA	Sputum	R	-	+	70/81	64/75	4.0/1.5	-	-	-	+	+
2482-91	AL	Throat	R	-	+	58/72	46/71	3.0/1.0	-	+	-	+	+
2483-91	AL	Throat	R	-	+	58/76	46/71	3.5/1.5	-	-	-	+	+
2497-91	AL	Throat	R	-	+	37/82	49/80	3.5/2.0	+	-	-	+	+
2946-98	AL	Throat	R	-	+	61/76	54/76	3.0/1.5	-	+	-	+	+
2987-98	AZ	NP swab	R	-	+	61/98	50/73	3.0/1.0	-	+	-	+	+

<sup>a</sup> <sup>T</sup>, type strain; GP, GenProbe Accuprobe Pneumococcus culture identification test; RBR, relative binding relation at 55°C (optimal temperature) and 70°C (stringent temperature); D, divergence calculated to the nearest 0.5%; ND, not done; AL, Alaska; AZ, Arizona; MD, Maryland; NS-CA, Nova Scotia, Canada; R, resistant; S, susceptible; NP, nasopharyngeal.

P-LVS and *S. pseudopneumoniae*. The strains of P-LVS were specifically selected from among strains that were submitted to the CDC *Streptococcus* Laboratory which had been difficult to identify or classify by using the standard methodology criteria. DNA-DNA reassociation analysis had been performed with these isolates, in addition to the BS test, OPT, and the AccuProbe assay. The DNA-DNA reassociation values revealed that these P-LVS and the *S. pseudopneumoniae* strains (Table 2) were not *S. pneumoniae*. Analysis of these strains by real-time PCR demonstrated that the new *lytA*-CDC real-time PCR assay was the most specific (100%), showing no detectable fluorescent signal with DNA from the non-*S. pneumoniae* organisms in the specificity panel (Table 2). This was followed by the *psaA* real-time PCR (98%), which gave positive results with two of the *S. pseudopneumoniae* isolates, and the *lytA* real-time PCR (96%) published by McAvin et al. (20), which was positive for four *S. pseudopneumoniae* isolates. No amplification occurred with DNAs from P-LVS with the *lytA*, *lytA*-CDC, or *psaA* primer/probe sets (Table 2). The two *ply* assays gave positive reactions with all *S. pseudopneumoniae* isolates; of the other isolates of P-LVS, positive reactions occurred with both the *ply* (13 of 13) and the *ply*-CDC (10 of 13) assays, making final specificities of 78% and 81%, respectively.

**Detection of *S. pneumoniae* in clinical samples.** The five assays were used with three types of clinical specimens (described above) to evaluate and compare the results of the assays (Table 3). The results of all five assays showed excellent correlations. When specimens were positive or negative by one assay, the identical specimens were generally positive or negative, respectively, by the other assays. Only differences in the total numbers of positive and negative specimens for each were detected. Sensitivities were calculated on the basis of the results for the 15 culture-positive serum specimens, even though one of these was RNase P negative, indicating inhibition. The sensitivities with serum samples were 53% (8/15) for the *lytA*-CDC and *ply*-CDC assays (1 additional positive specimen for each assay, but the specimens were different), 47% (7/15) for the *lytA* and *psaA* assays, and 40% (6/15) for the *ply* assay. Analysis of the results for the *S. pneumoniae* culture-negative sera showed that there was a good correlation between the results of the assays and that the specificities were good. No positive results occurred by the *psaA*, *lytA*, and *ply* assays, resulting in 100% specificities with serum.

Analysis of the MEF and CSF specimens revealed that all five assays gave positive results for all 10 of the *S. pneumoniae*-positive MEF specimens and all 15 CSF specimens, yielding

TABLE 3. Assay results for clinical specimens for all five real-time PCRs

Specimen	<i>S. pneumoniae</i> culture result	No. of specimens	Real time-PCR result									
			<i>psaA</i>		<i>lytA</i>		<i>lytA</i> -CDC		<i>ply</i> -CDC		<i>ply</i>	
			Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
Serum	+	15 <sup>a</sup>	7	8	7	8	8 <sup>b</sup>	7	8 <sup>b</sup>	7	6	9
	-	15	0	15	0	15	1 <sup>b</sup>	14	1 <sup>b</sup>	14	0	15
MEF	+	10	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0
	-	10	6	4	6	4	6	4	7 <sup>b</sup>	3	6	4
CSF	+	15	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0
	-	10	1 <sup>c</sup>	9	2 <sup>b,c</sup>	8	3 <sup>b,c</sup>	7	2 <sup>b,c</sup>	8	2 <sup>c</sup>	8

<sup>a</sup> One serum specimen was RNase P gene negative.

<sup>b</sup> The averages of the  $C_T$  values was  $\leq 38$  for the *lytA*, *lytA*-CDC, and *ply*-CDC assays.

<sup>c</sup>  $C_T$  values were  $\leq 37$  for all five PCRs with the one specimen.

sensitivities of 100%. Evaluations of the specificities of the assays with the 10 culture-negative MEF specimens resulted in positive results with the same six MEF specimens by the *psaA*, *lytA*, *lytA*-CDC, and *ply* real-time PCR assays, yielding specificities of 40%. An additional specimen was positive by the *ply*-CDC assay, for a 30% specificity. Examination of the *S. pneumoniae*-negative CSF specimens showed good specificity. The numbers of positive results were 1 of 10 (90% specificity) for the *psaA* assay; 2 of 10 (80% specificity) for the *lytA*, *ply*-CDC, and *ply* assays; and 3 of 10 (70% specificity) for the *lytA*-CDC assay.

**Multiplex CDC real-time PCRs for *psaA*, *lytA*, and *ply*.** To ascertain if use of a combination of the primer/probe sets for the detection of all three genes (*psaA*, *lytA*, and *ply*) at once would be advantageous in improving sensitivity, we constructed a multiplex of the three newly developed assays. Evaluations of the LLDs with serial dilutions of known concentrations of the pneumococcal positive control strain ATCC 33400 were done, and the results were compared to those of the singleplex assay for each gene. These studies showed that the variation was less than  $\pm 1$   $C_T$  value (the cycle number at which the fluorescence value crosses the threshold) compared to the  $C_T$  values for all the singleplex PCRs. Evaluation of the *S. pseudopneumoniae* and other P-LVS bacteria yielded results similar to those of the individual assays. There were no additional positive or negative reactions.

## DISCUSSION

Newer nucleic acid techniques, particularly real-time PCR, offer an opportunity to readdress the problem of the diagnosis of *S. pneumoniae* disease. In the present study we developed three new *S. pneumoniae*-specific real-time PCRs and demonstrated their abilities to detect *S. pneumoniae* DNA from cultures and three different types of clinical samples. These new assays were compared with each other and with two previously described real-time PCRs, with promising results.

The LLDs for all five assays were excellent. All demonstrated a linear detection range of 6 orders of magnitude and gave positive amplifications signals with all *S. pneumoniae* serotypes and nontypeable *S. pneumoniae* strains tested. Specificity evaluations, however, indicated differences among the assays. None of the five assays amplified any of the nonstreptococcal species tested, but in contrast, the specificity was problematic for both *ply* real-time PCRs when the amplification of *S. pseudopneumoniae* and other isolates of P-LVS was evaluated; these assays lacked sufficient specificity and amplified these *S. pneumoniae*-related strains. Several researchers have investigated and reported on atypical alpha-hemolytic streptococci and their likenesses in their phenotypic and genotypic properties to *S. pneumoniae* strains (3, 17). Arbique et al. (3) described *S. pseudopneumoniae* species and thoroughly discussed the problems posed for *S. pneumoniae* disease diagnostics due to both the detection of the *ply* and the *lytA* genes in these organisms and also the high degree of sequence similarity found in the rRNA gene which is used in the GeneProbe AccuProbe Pneumococcus identification test. The present study added five more isolates of *S. pseudopneumoniae* whose identities were confirmed by DNA-DNA reassociation to the original ones described by Arbique et al. (3), and again the rRNA gene sequence region chosen by the GenProbe investigators for their test failed to discriminate between *S. pneumoniae* and *S. pseudopneumoniae*. The detection of *ply* in several P-LVS isolates and the detection of *psaA* and *lytA* in *S. pseudopneumoniae* isolates in this study reinforce the call for caution in choosing sequence regions when these genes are used for the development of diagnostic assays. In nature, a taxonomic situation exists in which many mosaic organisms that do not clearly fit any particular species is evolving over time, and this could explain the detection of these genes in pneumococcus-like organisms (3, 12, 17). The role of P-LVS, if any, in disease has yet to be elucidated. However, a recent publication by Keith et al. (17) describing a study of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) suggests that the isolation of *S. pseudopneumoniae* from sputum specimens was associated with both a history of COPD and the exacerbation of COPD (17). The increasing ability of laboratories to identify this species will help to elucidate its prevalence and clinical relevance. It is difficult to say if the lack of the ability to discriminate between them may have affected previous clinical studies on the detection and identification of *S. pneumoniae*, but this cannot be ruled out.

This study described rapid, reliable assays that clearly discriminate *S. pseudopneumoniae* and other P-LVS from *S. pneumoniae*. The P-LVS isolates in our specificity panel were intentionally selected because of the difficulty in classifying them,



and thus, their use provides a strict criterion for assay specificity determinations. Both the *lytA*-CDC and the *psaA* real-time PCR were highly specific, showing no amplification with P-LVS isolates. The *psaA* real-time PCR was slightly less specific, amplifying two of the *S. pseudopneumoniae* isolates. These results correlate with those of an earlier study that used conventional PCR, showing the utility of these genes in discriminating *S. pneumoniae* strains (21). Undoubtedly, the increasing incidence of isolation of P-LVS is certain to complicate diagnosis and create additional obstacles for pneumococcal assay design; therefore, their inclusion may be required in future specificity evaluations for pneumococcal assay development.

The clinical performance of these pneumococcal real-time PCR assays was assessed with a limited number of samples of three different clinical specimen types. Our studies and those of others indicate that the choice of specimen comes with its own set of problems and that many different factors affect the sensitivities of the assays. Overall, PCR of blood and blood fractions has been reported to be very unpredictable and challenging due to the presence of inhibitors in blood and the low numbers of pneumococci (10, 28, 33). In previous studies, others have shown that the rate of positivity is greater by PCR than by culture and have suggested that PCR is more sensitive (10, 28, 33). In our analysis of pneumococcal culture-positive serum specimens, the rates of positivity by the five real-time PCRs correlated well among the various assay but were lower than expected compared with the culture results. There are several possible explanations for this. These include delays in processing and storage of specimens, the drawing of blood at times different from those at which blood for culture was drawn, and the presence of low levels of inhibitors. Additionally, while viable organisms are not required for PCR amplification, the length of time after the initiation of antibiotic treatment and specimen collection may affect the reactivity of the PCR, as reported by Dagan et al. (10). Other PCR studies that have evaluated blood have cited one or more of these reasons for discordant results (28, 29). For the specimens evaluated in this study, it is possible that both the storage conditions and the inability to perform PCR at the same time that the blood culture was performed may be factors. Thus, a prospective study with serum specimens collected and stored specifically for PCR would be a better indicator of the true value of these real-time PCRs with serum specimens. Use of MEF and CSF specimens, on the other hand, proved to be 100% sensitive, possibly reflecting the lack of or the presence of lower levels of inhibitors or the ease of removal of inhibitors during extraction and the higher bacterial counts generally seen in MEF specimens than in blood.

Among the culture-negative samples of all three specimen types (serum, MEF, and CSF), some real-time PCR amplification of the samples occurred. Again, this occurred in most cases with identical samples, and there was close to 100% agreement between all five assays, with one or two specimen outliers. In cases in which this occurred, the average of the  $C_T$  value was  $>38$ , which is very close to the assay  $C_T$  limit of 40. The amplification of samples that are culture negative has been reported in previous publications and has been attributed to one or more of the following: (i) the superior sensitivity of PCR methods over that of culture, (ii) amplification of viridans group streptococcus-related se-

quences, (iii) detection of bacterial DNA from dead organisms, or (iv) contamination (15, 16, 27). The fact that we detected *S. pneumoniae* in MEF specimens that were culture positive only for *H. influenzae* is not surprising; other investigators have reported that up to approximately 24% of MEF samples from patients result in mixed *S. pneumoniae*-*H. influenzae* culture isolations (4, 9, 31). Thus, another plausible explanation for these *S. pneumoniae* culture-negative, PCR-positive MEF specimens is dual infection not revealed by culture, for even though *S. pneumoniae* was undetectable by culture, its presence and/or the presence of its DNA cannot be ruled out. Additionally, *S. pneumoniae* has previously been detected in healthy children by PCR (for the *ply* gene) of serum samples and was attributed to the carriage of *S. pneumoniae* (10), which might be doubtful, since *ply* gene PCRs have been found to be nonspecific (21). In our study, the high specificities of the *lytA* and *psaA* assays make it highly unlikely that atypical alpha-hemolytic streptococci are responsible for the amplification of these culture-negative clinical samples. In addition, our strict laboratory methods regarding PCR procedures and the fact that the same samples that were positive by one assay were positive by the other assays lend support to the true-positive results for these samples and not positive results due to contamination by PCR amplicons. Moreover, with samples from nonsterile sites such as MEF and the difficulty of pneumococcal culture, the real-time PCR positivity of culture negative specimens is not unexpected. Therefore, we suspect that amplification for these culture-negative specimens is most likely indicative of the greater sensitivity of real-time PCR or the amplification of DNA still present in specimens from patients treated with antibiotics.

Despite the limited numbers of specimens tested, there was very good agreement among the results of the assays. The results with clinical samples were good overall and very promising. LLD estimations indicate that the real-time assays are highly sensitive, detecting at least 10 copies for *ply* and *lytA*. However, a true clinical assessment must await the execution of much larger, well-defined clinical studies with different types of specimens. Our results clearly demonstrate the enhanced specificities of the *lytA*-CDC and *psaA* assays for the detection of true *S. pneumoniae* strains. Although the two *ply* assays were shown to be very sensitive, they were much less specific and their use could be problematic, especially if they were applied to the analysis of specimens from nonsterile sites. The true value of real-time PCR for the diagnosis of pneumococcal disease is not yet firmly established, and thus, no one assay is routinely used. The newly developed assays described here present the opportunity to use not only assays with high sensitivities but also assays that have improved specificities compared with those of the assays currently in use. The improvement in specificity allows their use with specimens from nonsterile sites as well as sterile sites, making them suitable for use for diagnosis and in carriage studies.

Currently, the trend is to use multiplex assays for the simultaneous detection of various pathogens, providing a savings in time and money. We have done this for a single pathogen but propose that our *lytA*-CDC or *psaA* primer/probe sets would provide high specificity in an array for respiratory pathogen detection multiplexed with primers and probes for the detec-

tion of other respiratory pathogens. This potential for multiplexing and the speed of performance make these assays promising tools for molecular detection and epidemiologic carriage studies. This technology should offer an added advantage when it is used in conjunction with other assays for pneumococcal disease diagnosis.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jonas Winchell for his suggestion to improve the probe for the *lytA*-CDC assay.

M. D. G. S. Carvalho was supported by a U.S. Department of Energy ORISE fellowship, and M. Whaley was supported by an Association of Public Health Laboratories Emerging Infectious Diseases fellowship.

#### REFERENCES

- Advisory Committee on Immunization Practices. 2000. Preventing pneumococcal disease among infants and young children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morb. Mortal. Wkly. Rep. Recomm. Rep.* **49**:1–35.
- Apfalter, P., B. Stoiser, W. Barousch, M. Nehr, L. Kramer, and H. Burgmann. 2005. Community-acquired bacteria frequently detected by means of quantitative polymerase chain reaction in nosocomial early-onset ventilator-associated pneumonia. *Crit. Care Med.* **33**:1492–1498.
- Arbique, J. C., C. Poyart, P. Trieu-Cuot, G. Quesne, M. G. S. Carvalho, A. G. Steigerwalt, R. E. Morey, D. Jackson, R. J. Davidson, and R. R. Facklam. 2004. Accuracy of phenotypic and genotypic testing for identification of *Streptococcus pneumoniae* and description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* **42**:4686–4696.
- Arguedas, A., R. Dagan, E. Leibovitz, A. Hoberman, M. Pichichero, and M. Paris. 2006. A multicenter, open label, double tympanocentesis study of high dose cefdinir in children with acute otitis media at high risk of persistent or recurrent infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **25**:211–218.
- Barenfanger, J., C. Drake, N. Leon, T. Mueller, and T. Trout. 2000. Clinical and financial benefits of rapid detection of respiratory viruses: an outcomes study. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2824–2828.
- Barzilay, E. J., K. L. O'Brien, Y. S. Kwok, R. M. Hoekstra, E. R. Zell, R. Reid, M. Santosham, C. G. Whitney, and D. R. Feikin. 2006. Could a single dose of pneumococcal conjugate vaccine in children be effective? Modeling the optimal age of vaccination. *Vaccine* **24**:904–913.
- Brenner, D. J., A. C. McWhorter, J. K. Leete Knutson, and A. G. Steigerwalt. 1982. *Escherichia vulneris*: a new species of *Enterobacteriaceae* associated with human wounds. *J. Clin. Microbiol.* **15**:1133–1140.
- Corless, C. E., M. Guiver, R. Borrow, V. Edwards-Jones, A. J. Fox, and E. B. Kaczmarski. 2001. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **39**:1553–1558.
- Dagan, R., C. E. Johnson, S. McLinn, N. Abughali, J. Feris, E. Leibovitz, D. J. Burch, and M. R. Jacobs. 2000. Bacteriologic and clinical efficacy of amoxicillin/clavulanate vs. azithromycin in acute otitis media. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **19**:95–104.
- Dagan, R., O. Shriker, I. Hazan, E. Leibovitz, D. Greenberg, F. Schlaeffer, and R. Levy. 1998. Prospective study to determine clinical relevance of detection of pneumococcal DNA in sera of children by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **36**:669–673.
- Dowell, S. F., R. L. Garman, G. Liu, O. S. Levine, and Y. H. Yang. 2001. Evaluation of Binax NOW, an assay for detection of pneumococcal antigen in urine samples performed among pediatric patients. *Clin. Infect. Dis.* **32**:824–825.
- Dowson, C. G. 2004. What is a pneumococcus? p. 3–14. *In* E. I. Tuomanen, T. J. Mitchell, D. A. Morrison, and B. G. Spratt (ed.), *The pneumococcus*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Emery, S. L., D. D. Erdman, M. D. Bowen, B. R. Newton, J. M. Winchell, R. F. Meyer, S. Tong, B. T. Cook, B. P. Holloway, K. A. McCaustland, P. A. Rota, B. Bankamp, L. E. Lowe, T. G. Ksiazek, W. J. Bellini, and L. J. Anderson. 2004. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for SARS-associated coronavirus. *Emerg. Infect. Dis.* **10**:311–316.
- Facklam, R. R., and N. Pigott. 1994. Description of phenotypic characteristics to aid in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. *In* A. Totollan (ed.), *Pathogenic streptococci: present and future*. Lancer Publications, St. Petersburg, Russia.
- Greiner, O., P. J. R. Day, P. P. Bosshard, F. Imeri, M. Altwegg, and D. Nadal. 2001. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal secretions by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **39**:3129–3134.
- Kajjalainen, T., S. Rintamaki, E. Herva, and M. Leinonen. 2002. Evaluation of gene-technological and conventional methods in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Microbiol. Methods* **51**:111–118.
- Keith, E. R., R. G. Podmore, T. P. Anderson, and D. R. Murdoch. 2006. Characteristics of *Streptococcus pseudopneumoniae* isolated from purulent sputum samples. *J. Clin. Microbiol.* **44**:923–927.
- Korppi, M., M. Koskela, E. Jalonen, and M. Leinonen. 1992. Serologically indicated pneumococcal respiratory infection in children. *Scand. J. Infect. Dis.* **24**:437.
- Lhull, D., R. Lopez, and E. Garcia. 2006. Characteristic signatures of the *lytA* gene provide a basis for rapid and reliable diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections. *J. Clin. Microbiol.* **44**:1250–1256.
- McAvin, J. C., P. A. Reilly, R. M. Roudabush, W. J. Barnes, A. Salmen, G. W. Jackson, K. K. Beninga, A. Astorga, F. K. McCleskey, W. B. Huff, D. Niemeyer, and K. L. Lohman. 2001. Sensitive and specific method for rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* using real-time fluorescence PCR. *J. Clin. Microbiol.* **39**:3446–3451.
- Messmer, T. O., J. S. Sampson, A. Stinson, B. Wong, G. M. Carlone, and R. R. Facklam. 2004. Comparison of four polymerase chain reaction assays for specificity in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **49**:249–254.
- Murdoch, D. R. 2005. Impact of rapid microbiological testing on the management of lower respiratory tract infection. *Clin. Infect. Dis.* **41**:1445–1447.
- Murdoch, D. R., R. T. R. Laing, G. D. Mills, N. C. Karalus, G. I. Town, S. Mirrett, and L. B. Reller. 2001. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen in urine samples from adults with community-acquired pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* **39**:3495–3498.
- Norrby, S. R., and K. A. Pope. 1979. Pneumococcal pneumonia. *J. Infect.* **1**:109–120.
- Ruoff, K., L. R. A. Whaley, and D. Beighton. 2003. *Streptococcus*, p. 405–421. *In* P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Tenover, M. A. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Saukkoriipi, A., K. Leskela, E. Herva, and M. Leinonen. 2004. *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal secretions of healthy children: comparison of real-time PCR and culture from STGG-transport medium. *Mol. Cell. Probes* **18**:147–153.
- Saukkoriipi, A., A. Palmu, T. Kilpi, and M. Leinonen. 2002. Real-time quantitative PCR for the detection of *Streptococcus pneumoniae* in the middle ear fluid of children with acute otitis media. *Mol. Cell. Probes* **16**:385–390.
- Sheppard, C. L., T. G. Harrison, R. Morris, A. Hogan, and R. C. George. 2004. Autolysin-targeted LightCycler assay including internal process control for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in clinical samples. *J. Med. Microbiol.* **53**:189–195.
- Skerrett, S. J. 1999. Diagnostic testing for community-acquired pneumonia. *Clin. Chest Med.* **20**:531–548.
- Sorensen, U. B. S., and J. Heinrichsen. 1987. Cross-reactions between pneumococci and other streptococci due to C polysaccharide and F antigen. *J. Clin. Microbiol.* **25**:1854–1859.
- Soriano, F., A. Parra, C. Cenfor, E. Nieto, G. Garcia-Calvo, M. J. Gimenez, L. Aguilar, and C. Ponte. 2000. Role of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in the development of acute otitis media and otitis media with effusion in a gerbil model. *J. Infect. Dis.* **181**:646–652.
- van der Hoek, L., K. Pyrc, M. Jebbink, W. Vermeulen-Oost, R. Berkout, K. Wolthers, P. Wertheim-van Dillen, J. Kaandorp, J. Spaargaren, and B. Berkhout. 2004. Identification of a new human coronavirus. *Nat. Med.* **10**:368–373.
- van Haefen, R., S. Palladino, I. Kay, T. Keil, C. Health, and G. W. Waterer. 2003. A quantitative LightCycler PCR to detect *Streptococcus pneumoniae* in blood and CSF. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **47**:407–414.