

تشخیص سریع مننژیت مننگوکوکی با روش PCR

رضانعلی عطایی Ph.D.^۱، مهدی قربانعلی زانگان M.Sc.^۱، مسعود حاجیا Ph.D.^۱
علی مهربانی توانا Ph.D.^۲، زهرا گودرزی M.Sc.^۳، فرخ نخجوانی Ph.D.^۲

۱. دانشگاه علوم پزشکی بقیه... پژوهشکده طب رزمی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی
۲. دانشگاه علوم پزشکی بقیه... پژوهشکده طب رزمی، مرکز تحقیقات بهداشت نظامی
۳. دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی

✉ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۵۸۷-۱۹۹۴۵، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی
پست الکترونیک: [Email:ataee@bmsu.ac.ir](mailto:ataee@bmsu.ac.ir)

چکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۲/۲۵، پذیرش مقاله: ۸۵/۵/۱۸

هدف: طراحی و کاربرد روش حساس و اختصاصی PCR برای تشخیص نایسریا مننژیتیدیس در نمونه‌های بالینی
مواد و روش‌ها: ژن *ctrA* به عنوان ژن اختصاصی برای شناسایی نایسریا مننژیتیدیس انتخاب شد. به منظور بهینه‌سازی آزمایش از سویه استاندارد نایسریا مننژیتیدیس گروه B با کد ATCC;13090 و نمونه بالینی نایسریا مننژیتیدیس گروه C استفاده شد. برای بررسی از باکتری‌های پاتوژن هموفیلوس آنفلوآنزا تیپ b، اشریشیا کولی ATCC;35218، انتروباکتر، کلبسیلا پنومونیه، استرپتوکوک پنومونیه، استافیلوکوک آرنوس و استرپتوکوک گروه D استفاده شد. برای استخراج DNA از روش فنل کلروفرم استفاده و محصول پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۲ درصد با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و شناسایی شد.
یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد باکتری‌های استاندارد مورد آزمایش، محصول مورد نظر را تولید می‌کنند. در حقیقت، جفت پرایمر انتخاب شده، محصولی در اندازه ۱۰۱bp تولید می‌کند. آزمایش اختصاصیت نشان داد روش حاضر با هیچ یک از باکتری‌های غیرهدف واکنش نشان نمی‌دهد. بررسی حساسیت نیز نشان داد که حد نهایی تشخیص DNA نایسریا مننژیتیدیس در این روش ۵۰۰fg است.

نتیجه‌گیری: نتایج بهینه‌سازی نشان داد که روش PCR طراحی شده در این تحقیق از سرعت، حساسیت و اختصاصیت لازم برخوردار است و دستیابی به نتیجه نهایی در زمانی کمتر از سه ساعت امکان پذیر است، به کارگیری این روش در آزمایشگاه‌های بالینی تشخیص سریع نایسریا مننژیتیدیس را در نمونه‌های بالینی امکان پذیر می‌کند.

کلیدواژگان: مننژیت، نایسریا مننژیتیدیس، PCR، ژن *ctrA*

فصلنامه پزشکی باخته، سال هشتم، شماره ۲، تابستان ۸۵، صفحات ۹۷-۹۲

مقدمه

مشاهده مستقیم کوکسی‌های گرم منفی در لام میکروسکوپی است. این باکتری بسیار حساس است و به علت تجویز آنتی‌بیوتیک قبل از نمونه‌گیری، حساسیت کشت به شدت کاهش می‌یابد. به علاوه تشخیص با این روش بیش از ۳۶ ساعت طول می‌کشد در حالی که عدم تشخیص و درمان به موقع در مدت ۱۲ ساعت باعث مرگ می‌شود (۱)، (۲، ۷). لذا، دستیابی به یک روش مناسب و سریع تشخیص مننگوکوک در نمونه بالینی بسیار با ارزش خواهد بود. از مهم‌ترین این آزمایش‌ها، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) را می‌توان نام برد (۸)، چرا که تحت تاثیر درمان آنتی‌بیوتیکی که در هنگام شک به مننژیت باکتریال قبل از آنتی‌بیوگرام استفاده می‌شود و نحوه انتقال نمونه که سبب مرگ باکتری می‌شود قرار نمی‌گیرد و حساسیت آن بیش از ۹۰ درصد گزارش شده است (۹، ۱۰). از این رو، مراکز مختلف تحقیقاتی و درمانی مبادرت به طراحی، ارزیابی و کاربرد واکنش PCR برای تشخیص عوامل ایجاد کننده مننژیت کرده‌اند (۱۱، ۱۲). به طوری که با چنین روش‌های پیشرفته‌ای قادر به تشخیص هم‌زمان و سریع چند عامل هستند (۱۳).

با توجه به این مسائل و نیز احتمال بروز اپیدمی‌های مننژیت

عفونت‌های ناشی از نایسریا مننژیتیدیس در سراسر دنیا شایع و میزان ابتلا و مرگ و میر ناشی از آن در همه کشورهای جهان از مشکلات مهم بهداشتی است (۱، ۲). این باکتری در دستگاه تنفس فوقانی ۵ تا ۱۵ درصد افراد جامعه بدون ایجاد علامت بالینی کلونیزه می‌شود و با راه‌یابی به پرده‌های مغز می‌تواند بیماری کشنده مننژیت را ایجاد کند (۳، ۴). در ایران بر اساس اطلاعات مرکز مبارزه با بیماری‌های وزارت بهداشت میزان بروز بیماری بین ۰/۵ تا ۱ مورد در هر صد هزار نفر جمعیت تخمین زده می‌شود (۵). با این حال، از میزان مرگ و میر ناشی از مننژیت مننگوکوکی اطلاعات دقیقی در دست نیست. این بیماری علاوه بر قدرت کشندگی بالا باعث ایجاد ناتوانی‌هایی همچون ناشنوایی در بیماران نجات یافته از مرگ می‌شود. مننژیت مننگوکوکی همچنین در نیروهای نظامی و به ویژه سربازان از اهمیت زیادی برخوردار است. با وجود آن که همه سربازان قبل از شروع خدمت سربازی در مقابل این بیماری واکسینه می‌شوند، ابتلا به مننژیت مننگوکوکی همچنان گزارش می‌شود (۶).

در حال حاضر روش استاندارد برای تشخیص مننگوکوک، کشت و

۲۰۰۴ میلادی برای شناسایی نایسریا مننژیتیدیس استفاده شده بود، انتخاب و مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس میزان حساسیت و اختصاصیت پرایمرها و نتایج آنالیز آنها با نرم افزارملکولی BLAST پرایمر مطلوبی که مشخصات آن در جدول ۱ ذکر شده است برای تشخیص نایسریا مننژیتیدیس انتخاب شد. بررسی نرم افزار مولکولی این ژن‌ها و پرایمرهای ارایه شده نشان داد که سکانس انتخاب شده از ژن *ctrA* مناسب‌ترین ژن برای شناسایی مننگوکوک‌ها است.

جدول ۱: سکانس پرایمر انتخاب شده به منظور تشخیص نایسریا مننژیتیدیس

Primers	Sequences
Forward	5'-GTA-GGT-GGT-TCAACG-GCA-A-A-3'
Reverse	5'-TCG-CGG-ATT-TGC-AAC-TAA-A-T-3'

استخراج ژنوم

برای استخراج ژنوم از روش فنل کلروفرم استفاده شد. به این ترتیب که برای *set up* کردن آزمایش PCR ابتدا چند کلونی از باکتری‌های استاندارد به ۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی اضافه و سانتیفریوژ شد (۵۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه)، به رسوب حاصل ۵۰۰ میکرولیتر بافر Salt Tris EDTA افزوده و پس از ۱۰ دقیقه و مخلوط کردن آن ۱۸۰ میکرولیتر SDS دو درصد به آن اضافه شد. سپس ۳۷۵ میکرولیتر استات سدیم به آن افزوده و ۱۰ بار به شدت تکان داده شد. آن گاه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتیفریوژ و به محلول رویی ۷۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در یخچال در دمای منهای ۲۰ درجه نگهداری و پس از آن سانتیفریوژ شد (۱۵۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد). به رسوب حاصل ۳۷۵ میکرولیتر اتانل ۷۰٪ افزوده و پس از مخلوط شدن به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ سانتیفریوژ شد. در انتها به رسوب حاصل ۲۵ میکرولیتر بافر TE اضافه و جهت انجام PCR استفاده شد.

بهینه‌سازی مواد لازم برای واکنش PCR

برای رسیدن به این هدف چندبار فرآیند PCR با ژنوم سویه‌های استاندارد انجام شد و در هر مرحله یکی از غلظت‌های مواد اولیه (پرایمرها، $MgCl_2$ ، dNTP و آنزیم Taq پلی‌مراز) استفاده شد و در نهایت مناسب‌ترین مقادیر مواد لازم برای انجام PCR انتخاب شدند. دمای اتصال پرایمرها، پروفایل‌های حرارتی و زمان در واکنش تغییر داده شد تا بهترین شرایط PCR فراهم شود. برای بهینه‌سازی دمای اتصال پرایمرها (Annealing) از درجه حرارت‌های ۵۶، ۵۷، ۵۸/۸، ۵۹/۹، ۶۱/۲، ۶۲/۷، ۶۳/۲ درجه سانتی‌گراد استفاده شد.

کشت باکتریولوژیک نمونه‌های CSF و استخراج ژنومی آنها

طی ۱۵ ماه، از آبان ۱۳۸۳ تا بهمن ۱۳۸۴ مجموعاً ۷۰ نمونه مایع نخاع از بیماران با علائم مننژیت بستری شده در اورژانس بیمارستان بقیه‌... (عج)، بیمارستان ۵۰۵ و بیمارستان ۵۰۲ ارتش، از نظر

مننگوکوکی در نیروهای نظامی و ضرورت تشخیص سریع این بیماری در سال‌های اخیر استفاده از تکنولوژی ژن و ظهور PCR امیدهایی را در تشخیص سریع مننژیت‌های مننگوکوکی به وجود آورده است (۱۴)، (۱۵).

شواهد موجود موید آن است که استفاده از PCR می‌تواند با دقت بیش از ۹۰ درصد وجود مننگوکوک را نشان دهد (۱۶). از این رو، هدف از این مطالعه، طراحی روش PCR برای تشخیص نایسریا مننژیتیدیس است. به طوری که به وسیله آن بتوان عفونت‌های مننژیت مننگوکوکی را سریع‌تر شناسایی کرد و به درمان اختصاصی آن پرداخت.

مواد و روش‌ها

سویه‌های

Neisseria meningitidis (ATCC-13090), *Escheichia Coil* (ATTC-35218), *Haemophilus influenza* Type b (ATCC 49766)

از شرکت Mast و

Streptococcus group, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* sero groupe C

از آزمایشگاه بیمارستان بقیه‌... تهیه شد.

محیط‌های کشت: BHI Broth و Thayer – Martin Agar.

معرف اکسیداز و تست‌های افتراقی از شرکت Merck تهیه شد.

روش تعیین مقدار DNA بر اساس میزان حساسیت رنگ اتیدیوم بروماید

با توجه به این که توانایی روش الکتروفورز در رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در تعیین DNA در بهترین شرایط یک نانوگرم است، (۱۷) نمونه خالص شده از محیط کشت با رقت سریالی ۱/۲ تا ۱/۸۰ رقیق و ضعیف‌ترین باند انتخاب شد.

روش تخمین مقدار DNA بر اساس تعداد باکتری (CFU)

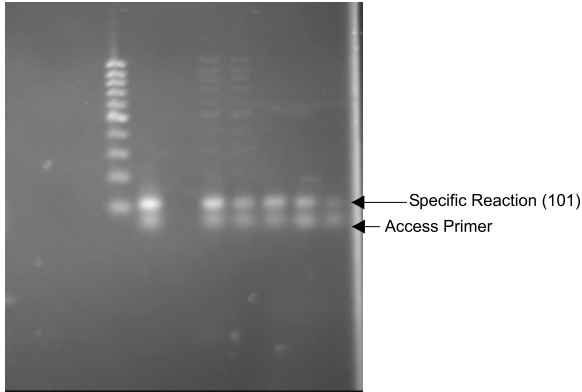
با توجه به این که هر باکتری دارای یک کروموزوم است و در صورتی که کشت داده شود، هر باکتری قادر به تولید یک کلونی است از سوسپانسیون باکتری، رقت تهیه و با روش میسر و میلز میزان باکتری در واحد حجم بر اساس CFU تخمین زده شد.

پرایمر

پس از بررسی منابعی که از PCR برای تشخیص نایسریا مننژیتیدیس استفاده کرده بودند، تمام ژن‌ها و پرایمرهایی که تا کنون استفاده شده بودند، مورد بررسی قرار گرفت. از بین آنها پرایمرهایی که تعداد بیشتری از گروه‌های سرمی مننگوکوک را شناسایی کرده بودند، مشخص شد. پرایمرهای مربوط به ژن‌های: *dhps*, *IS1106*, *16S rRNA*, *SiaD*, *ctrA* که از سال ۱۹۹۲ تا

تشخیص سریع مننژیت مننکوکی

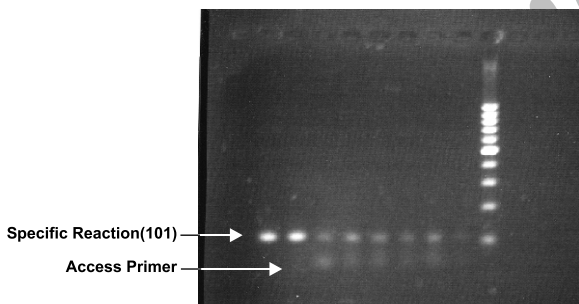
درصد الکتروفورز شد. نتیجه حاصل از الکتروفورز بیانگر آن بود که هیچ یک از باکتری‌های فوق به جز گروه‌های سرمی نایسریا مننژیتیدیس محصول اختصاصی ۱۰۱bp را تولید نکردند.



شکل ۱: نتایج حاصل از بهینه‌سازی دمای Annealing

تعیین میزان حساسیت

رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-8} از ژنوم سویه استاندارد تهیه و از این رقت‌ها PCR انجام شد. نتایج PCR در شکل ۲ نشان داده شده است. به این ترتیب PCR طراحی شده در این تحقیق قادر به شناسایی ۵۰۰fg از ژنوم نایسریا مننژیتیدیس است.



شکل ۲: گرادیان غلظت ژنوم نایسریا مننژیتیدیس سویه استاندارد

نتایج کشت، مشاهده مستقیم و PCR نمونه‌های CSF از نظر

وجود نایسریا مننژیتیدیس

بررسی‌های باکتریولوژیک و نیز PCR ۷۰ نمونه CSF در جدول ۳ خلاصه شده است. چنانچه می‌بینیم چهار نمونه CSF با نتیجه کشت منفی با PCR از نظر نایسریا مننژیتیدیس مثبت گزارش شد. این در حالی است که تنها یک مورد از چهار مورد در مشاهده مستقیم لام رنگ‌آمیزی شده با روش گرم مثبت گزارش شد اما با مشاهده لام مرطوب (Wet mount)، هفت مورد و با PCR نه مورد مثبت گزارش شد.

باکتریولوژیک (مشاهده مستقیم، کشت و شناسایی)، بررسی شد. هم‌زمان با آن، برای انجام PCR نمونه‌ها، استخراج ژنومی انجام شد. برای این منظور، با رعایت شرایط آسپتیک ۱ میلی‌لیتر از هر نمونه CSF را سانتریفیوژ نموده و همانند فوق ژنوم استخراج و با افزودن ۲۵ میکرولیتر بافر TE به آن جهت انجام PCR در دمای منهای ۷۰ درجه در یخچال نگهداری شدند.

انجام PCR نمونه‌های CSF

پس از استخراج ژنومی از نمونه‌های مایع نخاع بیماران مبتلا به مننژیت طبق برنامه (پروتکل و پروفایل حرارتی بهینه شده نهایی) واکنش PCR با هر یک از آنها انجام شد. همچنین، از ژل آگارز دو درصد برای الکتروفورز محصولات PCR استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از آزمایش دماها، زمان‌ها و غلظت‌های مختلف مواد برای دستیابی به بهترین نتیجه PCR در ناحیه ۱۰۱bp در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲: شرایط بهینه شده لازم برای دستیابی به بهترین نتیجه PCR

Amplification Condition	
Reaction Mixture	
Primer concentration	۰/۳ میکرومولار
MgCl ₂ concentration	۱/۵ میلی‌مولار
dNTP concentration	۰/۲ میلی‌مولار
Taq polymerase	۰/۵ یونیت
Amplification Program	
Denaturation	۹۴° C for ۱۵ S
Annealing	۶۱/۲° C for ۳۰ S
Extention	۷۲° C for ۴۵ S
Cycle number	۳۰

دمای اتصال پرایمرها (Annealing)

برای تعیین بهترین دمای اتصال برای پرایمر درجه حرارت مراحل مختلف در واکنش PCR تغییر داده شد (شکل ۱). با توجه به نتایج به دست آمده دمای ۶۱/۲ درجه سانتی‌گراد به عنوان دمای Annealing انتخاب شد.

تعیین اختصاصیت PCR

برای تعیین اختصاصیت PCR ژنوم باکتری‌های زیر استخراج شد: *Streptococcus* group D, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* type b, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter*, *Neisseria meningitidis* (ATCC-13090), and *Neisseria meningitidis* sero groupe C سپس واکنش PCR انجام و محصولات PCR در ژل آگارز دو

جدول ۳: نتایج کشت، مشاهده مستقیم و PCR ۷۰ نمونه مایع نخاع از نظر تشخیص نایسریا مننژیتیدیس

نتیجه واکنش PCR	نتیجه کشت باکتریولوژیک	سروتیپ نایسریا مننژیتیدیس جدا شده	مشاهده لام رنگ آمیزی شده	مشاهده مستقیم با لام مرطوب	شماره نمونه
+	+	C	+	+	۱
+	+	C	+	+	۲
+	+	C	+	+	۳
+	+	C	+	+	۴
+	+	B	+	+	۵
+	-	نامشخص	+	+	۶
+	-	نامشخص	-	+	۷
+	-	نامشخص	-	-	۸
+	-	نامشخص	-	-	۹

بحث

هدف اصلی در این تحقیق راه اندازی روش PCR برای تشخیص نایسریا مننژیتیدیس در نمونه مایع نخاع بوده است. زیرا این روش نسبت

به روش‌های موجود نظیر کشت از سرعت و دقت بیشتری برخوردار است و روش استاندارد طلایی برای شناسایی قطعی نایسریا مننژیتیدیس کشت است. چنانچه نتایج نشان داد، می‌توان نایسریا مننژیتیدیس را در مدت ۳ ساعت شناسایی کرد.

در سال‌های اخیر مزایای روش‌های مبتنی بر PCR برای تشخیص سریع عوامل مختلف عفونت‌های میکروبی از جمله مننژیت باکتریال مورد توجه بوده است. لذا، با طراحی پرایمرهای مختلف اقدام به توسعه روش PCR برای شناسایی نایسریا مننژیتیدیس شده است. چنانکه کورلس و همکاران از ژن *ctrA* برای شناسایی نایسریا مننژیتیدیس در واکنش Multiplex PCR استفاده کرده‌اند. آنها برای افزایش توان شناسایی محصول از پروب و دستگاه Real-Time PCR استفاده کردند. این محققان توانستند با پرایمر ارایه شده، گروه‌های سرمی B, C, B, C, A, 29E, W135, X, Y, Z، را شناسایی کنند (۱۹).

همچنین جوردنس و همکاران از ژن *ctrA* برای شناسایی نایسریا مننژیتیدیس استفاده کردند. آنها از نمونه‌های سواب گلو و قرقره برای کشت و انجام PCR استفاده کردند، در تحقیق آنها مواردی از کشت مثبت و PCR منفی گزارش شد که نشانه حساسیت کم پرایمرهای معرفی شده است (۲۰).

ریچاردسون و همکاران برای شناسایی نایسریا مننژیتیدیس از ژن *ctrA* استفاده کردند و پرایمر ارایه شده را با پرایمرهای ژن *SiaD* و IS1106 مقایسه کردند، آنها نشان دادند که پرایمر به کار برده شده برای ژن *ctrA* نسبت به پرایمر ژن *SiaD* از حساسیت بیشتر و نسبت به پرایمر ژن IS1106 از حساسیت کمتری برخوردار است (۲۱). در نهایت اوستبو و همکاران نیز از ژن *ctrA* برای شناسایی نایسریا مننژیتیدیس در CSF و پلازما استفاده کردند. آنها برای افزایش توان شناسایی محصول از پروب و دستگاه Real-Time PCR استفاده کردند (۲۲).

بررسی نرم افزار مولکولی پرایمر ژن *ctrA* معرفی شده در این تحقیق نسبت به پرایمرهای ارایه شده در دیگر مقالات گروه‌های سرمی بیشتری

نتیجه گیری

در این تحقیق، قابلیت کاربرد آن را برای تشخیص مننژیتیدیس در نمونه مایع نخاع امکان پذیر کرده

مالی مرکز تحقیقات بهداشت نظامی دانشگاه علوم پزشکی بقیه... به انجام رسیده است. بدینوسیله از تمامی همکاران در دانشگاه علوم پزشکی بقیه... - پژوهشگاه طب نظامی - مرکز تحقیقات بهداشت و پرسنل آزمایشگاه بیمارستان بقیه... که در انجام این تحقیق ما را یاری کردند، به ویژه از خانم‌ها صفیری و احمدی و آقایان دکتر هاشم مدنی، دکتر مهدی خوبدل، دکتر سلطان پور، دکتر غلامعلی قربانی و حجت بستان صمیمانه تشکر می‌کنیم.

است اما باید توجه داشت که مننژیت باکتریایی اتیولوژی متعددی می‌تواند داشته باشد که مننگوکوک یکی از آنها است. با این حال، این روش زمینه اضافه کردن همزمان پرایمرهای اختصاصی باکتری‌های دیگر و توسعه آن به صورت Multiplex PCR را امکان پذیر کرده است.

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی است که با حمایت

References

1. Newcombe J, Cartwright K, Palmer W: PCR of peripheral blood for diagnosis of meningococcal disease. *Journal of Clin Microbiology* 1996; 34(7): 1637-1640
2. Sidikou F, Djibo S, Taha M.K, Alonso J.M, Djibo A, Kairo K.K, Chanteau S, and Boisier P: Polymerase chain reaction assay and bacterial meningitis surveillance in remote areas. *Niger Emerging Infect Dis* 2003; 9(11): 1486-1488
3. Dominque A, Caugant, Louise F, Mossa, Carl E, Frasch L, et al: Genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in relation to serogroup, serotype, and outer membrane protein pattern. *J of Bacteriology* 1987; 161(6): 2781-2792
4. Horton RE, Stuartj, Christensen H, Borrow R, Guthrie T, Davenport V: Finn a influence of age and carriage status on salivary IgA to *Neisseria meningitidis*. *Epidemiol Infect* 2005; 883-9
5. Shrzadi M, Pedram N, Guya M, and Zahraie M. *Information and Data of Communicable Diseases in Iran*. Ministry of Health and Medical Education Undersecretary for Health Affairs Center for Diseases Management 2004. Seda Publishing Center. P, 123-211
6. Ataee RA, Tavana Mehrabi A, Ghorbani GH, Mosavi SA, Karimi ZA, Hajia M. Recurrent Meningococcal Meningitis in an Iranian Conscript: a Brief Report. *Clinical Microbiology Newsletter* 2005; 27(17): 136-137
7. Irani F, Ruddell T: Meningococcal conjunctivitis. *Aust N Z J Ophthalmol* 1997; 167-8
8. Haolin NI, Angus I, Knight, Cartright K, Palmer W.H, Mcfadden J: Polymerase chain reaction for diagnosis of meningococcal meningitis. *Lancet* 1992; 340: 1432-143
9. Carrol E D, Thomson A P, Shears P, Gray S J, Kaczmarek E B, Hart C A: Performance characteristics of the polymerase chain reaction assay to confirm clinical meningococcal disease. *Arch Dis Child* 2000; 83: 271-273
10. Poppert S, Essig A, Stoehr B, Steingruber A, Wirths B, Juretschko S, Reischl U, Wellinghausen NJul: Rapid diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR and fluorescence in situ hybridization. *Journal of Clin*

- Microbiology 2005: 3390-7
11. 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): 890-5
12. Abdel-Salam HA. Direct PCR assay for detection of *Neisseria meningitidis* in human cerebrospinal fluid. *Folia Microbiol (Praha)*. 1999; 44(6): 689-94
13. Espy M J, Uhl R J, Sloan M L, Buckwalter P S, Jones M E, Vetter A E et al. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(1): 165-256
14. Guiver M, Borrow R, Marsh J, Gray SJ, Kaczmarek EB, Howells D, et al. Evaluation of the applied biosystems automated taqman polymerase chain reaction system for the detection of meningococcal. *FEMS Immunology and Medical Microbiol* 2000; 28(2): 173-179
15. Kristiansen BE, Ask E, Jenkins A, Fermer C, Radstrom P, Skold O. Rapid diagnosis of meningococcal meningitis by polymerase chain reaction. *Lancet* 1991; 337(8757): 1568-1569
16. Kotilainen P, Jalava J, Meurman O, Lehtonen P O, Rintala E, Seppala P, et al. Diagnosis of Meningococcal Meningitis by Broad-Range Bacterial PCR with Cerebrospinal Fluid. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36(8): 2205-2209
17. Sambrook J. & Russell David W: *Molecular cloning (a laboratory manual)*. Gold Spring. 4th ed Appendix, 2001. p: 1, 4, 6, 8, 9, 11
18. Ataee RA, Mehrabi Tavana A, Ghorbani GH, Karimi-Zarchi AA, Hajia M, Hosseini SMJ, and et al. Determination of Bacteriological Etiology of 100 CSF Samples of Patients with Meningitidis at four Military Hospitals in Tehran between 2003 and 2005. *Journal of Military Medicine* 2005; 7(1): 49-56
19. Corless C.E, Guluer M, Borrow R, Edwards V, Jones

C, Fox A T, Kaczmerski E B: Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitidis and septicemia using real – Time PCR. *Journal of Clin Microbiology* 2001; 39 (4): 1553 – 1558

20. Jordens J Z, Jeannette N, Williams, Graeme Jones R, and John E. H: Detection of meningococcal carriage by culture and PCR of throat swabs and mouth gages. *Journal of Clin Microbiology* 2002; 40 (1): 75- 79

21. Richardson D C, Louie L, Louie M, Simore A E:

Evaluation of rapid PCR assay for diagnosis of meningococcal meningitides. *Journal of Clin Microbiology* 2003; 41 (8): 3851- 3853

22. Ovstebo R, Brandzaeg P, Brusletto B, Haug K B F, Lande K, Hoiby E A, et al: Use of robotized DNA isolation and real – time PCR quantify and identify close correlation between levels of *Neisseria meningitidis*, DNA and lipopolisaccharid in plasma and CSF patients with meningococcal disease. *Journal of Clin Microbiology* 2004; 42 (7) 2980 – 2987

Archive of SID