تشخیص سریع منتژیت منتگوکوکی با روش PCR

رمضانعلی عطایی Ph.D [1*]، مهدی قربانعلی زانگان M.Sc [1]، مسعود حاجیا Ph.D [1]
علی مهرابی توانا Ph.D [2]، زهرا گودرزی M.Sc [1]، فرخ نخجوانی Ph.D [3]

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

* آدرس مکاتبه: تهران، صندوق‌پستی: ۵۸۷-۱۹۹۴۵، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی
پست الکترونیک: Email: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 منتژیتیدیس در نمونه‌های بالینی

مواد و روش‌ها: ژن ctrA به عنوان ژن اختصاصی برای شناسایی نایسریا منتژیتیدیس انتخاب شد. به منظور بهینه‌سازی آزمایش از سویه استاندارد نایسریا منتژیتیدیس گروه B با کد ATCC;13090 و نمونه بالینی نایسریا منتژیتیدیس گروه C استفاده شد. برای بررسی از باکتری‌های پاتوژن هموفیلوس آنفلوآنزا تیپ b، اشریشیا کولی ATCC;35218، انتروباکتر، کلبسیلا پنومونیه، استرپتوکوک پنومونیه، استافیلوکوک آرئوس 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 رنگ‌آمیزی 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 منتژیتیدیس 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 نتیجهٔ نهایی در زمانی کمتر از سه ساعت امکان پذیر است، به کارگیری این روش در آزمایشگاه‌های بالینی تشخیص سریع نایسریا منتژیتیدیس را در نمونه های بالینی امکان پذیر می کند.

کلیدواژگان: منتژیت، نایسریا منتژیتیدیس، PCR، ژن ctrA

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

مقدمه

عفونت‌های ناشی از نایسریا منتژیتیدیس در سراسر دنیا شایع و میزان ابتلا و مرگ و میر ناشی از آن در همهٔ 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 کشندهٔ منتژیت 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 صدهزار نفر جمعیت تخمین زده می‌شود (۵). با این حال، از میزان مرگ و میر ناشی از منتژیت منتگوکوکی اطلاعات دقیقی در دست نیست. این بیماری علاوه بر قدرت کشندگی بالا باعث ایجاد ناتوانی‌هایی همچون ناشنوایی در بیماران نجات یافته از مرگ می‌شود. منتژیت منتگوکوکی 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 منتژیت منتگوکوکی همچنان گزارش می‌شود (۶).

در حال حاضر روش استاندارد برای تشخیص منتگوکوک، کشت و مشاهدهٔ 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 منتگوکوک در نمونه بالینی بسیار با ارزش خواهد بود. از مهم‌ترین این آزمایش‌ها، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) را می‌توان نام برد (۸)، چرا که تحت تاثیر درمان آنتی‌بیوتیکی که در هنگام شک به منتژیت باکتریال قبل از آنتی‌بیوگرام استفاده می‌شود و نحوه انتقال نمونه که سبب مرگ باکتری می‌شود قرار نمی‌گیرد و حساسیت آن بیش از ۹۰درصد گزارش شده است (۹، ۱۰). از این‌رو، مراکز مختلف تحقیقاتی و درمانی مبادرت به طراحی، ارزیابی و کاربرد واکنش PCR برای تشخیص عوامل ایجاد کننده منتژیت 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 منتژیت

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 منتژیت‌های 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 منتژیتیدیس است. به طوری که به وسیلهٔ آن بتوان عفونت‌های منتژیت 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 pnemoniae*, *Neisseria meningitidis* sero groupe C

از آزمایشگاه بیمارستان بقیه‌ا... تهیه شد.

محیط‌های کشت: Thayer – Martin Agar و BHI Broth، 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 رنگ‌آمیزی 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 ۱/۸۰رقیق 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 میسرا و میلز میزان باکتری در واحد حجم بر اساس CFU تخمین زده شد.

پرایمر

پس از بررسی منابعی که از PCR برای تشخیص نایسریا منتژیتیدیس 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 ۲۰۰۴ میلادی برای شناسایی نایسریا منتژیتیدیس 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 نیسریا منتژیتیدیس 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 منتژیتیدیس

Primers	Sequences
Forward	۵′ -GTA-GGT-GGT-TCAACG-GCA-A-A-۳′
Reverse	۵′ -TCG-CGG-ATT-TGC-AAC-TAA-A-T-۳′

استخراج ژنوم

برای استخراج ژنوم از روش فنل‌کلروفرم استفاده شد. به‌این ترتیب که برای set up کردن آزمایش PCR ابتدا چند کلونی از باکتری‌های استاندارد به ۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی اضافه و سانتریفیوژ 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 به‌آن اضافه شد. سپس ۳۷۵ میکرولیتر استات‌سدیم به‌آن افزوده و ۱۰ بار به شدت تکان داده شد. آن‌گاه در ۴ درجه‌سانتی‌گراد سانتریفیوژ 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 سانتریفیوژ شد (۱۵۰۰۰ دور به‌مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد). به رسوب حاصل ۳۷۵ میکرولیتر اتانل ۷۰ افزوده و پس از مخلوط شدن به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ 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 و 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 مجموعا ۷۰ نمونه مایع نخاع از بیماران با علایم منتژیت بستری شده در اورژانس بیمارستان بقیه‌ا... (عج)، بیمارستان ۵۰۵ و بیمارستان ۵۰۲ ارتش، از نظر

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 به‌آن 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 نتیجهٔ PCR در ناحیهٔ ۱۰۱bp در جدول ۲ نشان داده شده است.

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

Amplification Condition	
Reaction Mixture	
Primer concentration	۰/۳ میکرومولار
MgCl2 concentration	۱/۵ میلی‌مولار
dNTP concentration	۰/۲ میلی‌مولار
Taq polymerase	۰/۵ یونیت
Amplification Program	
Denaturation	۹۴° C for ۱۵ S
Annealimg	۶۱/۲° C for ۳۰ S
Extention	۷۲° C for ۴۵ S
Cycle number	۳۰

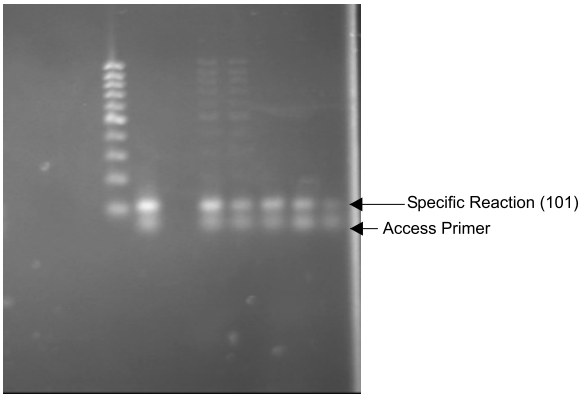
دمای اتصال پرایمرها (Annealing)

برای تعیین بهترین دمای اتصال برای پرایمر درجه حرارت مراحل مختلف در واکنش PCR تغییر داده شد (شکل ۱). باتوجه 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, Heamophilus influenzae type b, Streptococcus pneumoniae, Klebsilella pneumoniae, Enterobacter, Neisseria meningitidis* (ATCC-13090), and *Neisseria meningitidis* sero groupe C

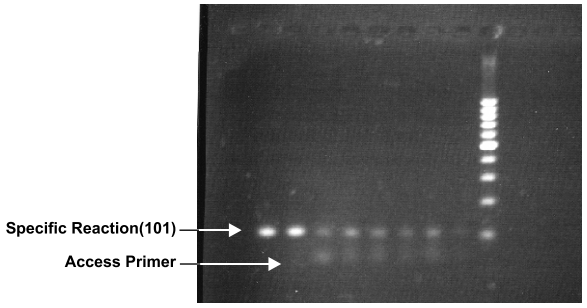
سپس واکنش PCR انجام و محصولات PCR در ژل آگارز دو درصد الکتروفورز شد. نتیجه حاصل از الکتروفورز بیانگر آن بود که هیچ یک از باکتری‌های فوق به جز گروه‌های سرمی نایسریا مننژیتیدیس محصول اختصاصی ۱۰۱bp را تولید نکردند.



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 نایسریامننژیتیدس 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.

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

نتیجه واکنش PCR	نتیجه کشت باکتریولوژیک	سروتیپ نایسریا منتژایتدیس جدا شده	مشاهده لام رنگ‌آمیزی شده	مشاهده مستقیم با لام مرطوب	شمارهٔ 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 منتژیتیدیس 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 منتژیتیدیس کشت است. چنانچه نتایج نشان داد، می‌توان نایسریا منتژیتیدیس را در مدت ۳ ساعت شناسایی کرد.

در سال‌های اخیر مزایای روش‌های مبتنی بر PCR برای تشخیص سریع عوامل مختلف عفونت‌های میکروبی از جمله منتژیت باکتریال مورد توجه بوده است. لذا، با طراحی پرایمرهای مختلف اقدام به توسعه روش PCR برای شناسایی نایسریا منتژیتیدیس شده است. چنانکه کورلس و همکاران از ژن ctrA برای شناسایی نایسریا منتژیتیدیس 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, 29E, W135, X, Y, Z, A، را شناسایی کنند (۱۹).

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

ریچاردسون و همکاران برای شناسایی نایسریا منتژیتیدیس 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 منتژیتیدیس درCSF و پلاسما 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 را شناسایی می‌کند، و از اختصاصیت بیشتری نیز برخوردار است. لذا این پرایمر در تحقیق حاضر انتخاب شده است.

در تحقیقات انجام شده قبل از سال ۲۰۰۱ میلادی به دلیل عدم شناسایی کامل ژنوم منتگوکوک از ژن ctrA کمتر استفاده شده است. هر چند از سال ۲۰۰۱ میلادی تا کنون برای این ژن پرایمرهایی معرفی شده است اما پروتکل ارایه شده برای PCR با این پرایمرها برای دستگاه‌های جدید مانند Real–Time PCR است. همچنین، برای افزایش حساسیت آزمایش از پروب استفاده کرده‌اند که به دلیل نبود این دستگاه ها در کشور ما، انجام این روش‌ها میسر نیست.

در این تحقیق برای افزایش حساسیت و اختصاصیت آزمایش از پروب استفاده نشد. بلکه با تغییر غلظت مواد شرکت کننده در واکنش و نیز تغییر دماها و سیکل‌های واکنش توانستیم گروه‌های سرمی B و C را شناسایی کنیم. هر چند در این تحقیق به دلیل عدم دسترسی به سایر گروه‌های سرمی نایسریا منتژیتیدیس (A, E29, W135, X, Y, Z) امکان بررسی گروه‌های سرمی بیشتر میسر نشد. اما نتایج آزمایش‌های مختلف با ژنوم باکتری های دیگر نشان داد این پرایمر با هیچ یک از باکتری‌های دیگر واکنش نشان نمی‌دهد. در نهایت با این تحقیق توان شناسایی منتگوکوک با استفاده از دستگاه های موجود و رنگ‌آمیزی اتیدیم بروماید در ژل آگارز بدون نیاز به پروب با حساسیت و اختصاصیت قابل قبول حاصل شد. ۷۰ نمونه CSF از بیماران مبتلا به منتژیت، از نظر باکتریولوژیک بررسی و همگی آنها PCR شدند. چنانچه در جدول ۳ ملاحظه می‌شود، روش PCR توانست در نه عدد از نمونه‌های CSF، وجود نایسریا منتژیتیدیس را نشان دهد. در حالی که در کشت باکتریولوژیک، تنها پنج مورد مثبت گزارش شد. هر چند مشاهده مستقیم نمونه، تایید قطعی عامل بیماری نیست با این حال، در مشاهده لام رنگ آمیزی شده شش مورد باکتری دیپلوکوک گرم منفی و در لام مرطوب هفت مورد دیپلوکوک مشاهده شد.

نتیجه‌گیری

هر چند طراحی روش PCR در این تحقیق، قابلیت کاربرد آن را برای تشخیص منتگوکوک‌ها در نمونه مایع نخاع امکان‌پذیر کرده

است اما باید توجه داشت که منتژیت 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 مالی مرکز تحقیقات بهداشت نظامی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... به انجام رسیده است. بدینوسیله از تمامی همکاران در دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... ـ پژوهشکده طب نظامی ـ مرکز تحقیقات بهداشت و پرسنل آزمایشگاه بیمارستان بقیه‌ا... 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 می کنیم.

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 Emeging Infect Dis 2003; 9(11): 1486-1488

3. Dominqe A, Caugant, Louise F, Mossa, Carl E, Frasch L, et al: Genetic structure of Neisseria meningitidis populations in relation to serogroup, serotype, and outer membranc 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 meningitides. Epidemiolol Infect 2005; 883-9

5. Shrzadi M, Pedram N, Guya M, and Zahraie M. Information and Data of Communicable Disseases 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 Ophthalmo 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, Kaczmarski 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):8 ۹۰-۵.

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, Kaczmarski 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 meningococclal meningitis by polymerase chain reaction. Lancet 1991; 337(8757): 1568-1569

16. Kotilanen 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 Clincal Microbiology 1998; 36(8): 2205–2209

17. Sambrook J. & Russell David W: Molecular cloning (a laboratory manual). Gold Spring.4 th ed Apendix, 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: Simultaneus detection of Neisseria meningitides, Haemophilus influanzae, and Stereptococcus Pnomoniae in suspected cases of meningitidis and septisemia 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 gageles . Journal of Clin Microbiology 2002; 40 (1): 75- 79

21. Richardson D C, Louie L, Louie M, Simore A E: Evalotion of rapid PCR assay for diagnosis of meningococal 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 crrrelation between levels of Neisseria meningitides, DNA and lipopolisacarid in plasma and CSF patients with meningococal disease. Journal of Clin Microbiology 2004; 42 (7) 2980 – 2987