مجله میکروب شناسی پزشکی ایران

سال ۱ شماره ۱ بهار ۱۳۸۶، صفحات ۶۱ – ۶۶

مزایای تشخیص سریع مننژیت باکتریایی به‌روش مولکولی در مقایسه با کشت و مشاهده مستقیم میکروسکوپی مایع نخاع

رمضانعلی عطایی*[۱و۳]، علی مهرابی توانا[۲]، زهرا سفیری[۳]، علی کرمی[۳]، مرتضی ایزدی[۲]، سید محمد جواد حسینی[۳]

۱) گروه میکروب شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»

۲) گروه میکروب شناسی و مرکز تحقیقات بهداشت نظامی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»

۳) مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»

نویسنده رابط: رمضانعلی عطایی، گروه میکروب شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۳/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۶/۴/۳

چکیده:

زمینه و اهداف: مننژیت حاد باکتریال یک عامل مهم مرگ و میر باقی مانده که در افراد نجات یافته، ممکن است با ایجاد ضایعات عصبی دایمی همراه گردد. لذا، تشخیص سریع اتیولوژی مننژیت باکتریال و درمان مناسب آن یک امر حیاتی می‌باشد. از این رو، هدف این تحقیق مقایسه روش مولکولی MultiplexPCR با روش‌های باکتریولوژیک و نیز مشاهده مستقیم مایع نخاع جهت تشخیص سریع باکتری‌های شایع عامل مننژیت می‌باشد.

روش بررسی: در این تحقیق، ۱۵۰ نمونه مایع نخاع بیماران مشکوک به‌مننژیت را با استفاده از PCR هدف‌مند شده با پرایمرهای عمومی بر اساس ژن *16S rRNA* و نیز پرایمرهای اختصاصی جهت باکتری‌های نیسریا مننژیتیدیس، استرپتوکوکوس پنومونیه و هموفیلوس اینفلونزا استفاده گردید. همچنین، سایر روش‌های باکتریولوژیک و نیز میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: استفاده از چند روش تشخیصی همزمان، امکان تشخیص سریع اتیولوژی باکتریال را در افراد مبتلا به‌مننژیت مهیا نمود. چنانچه با روش مولکولی تشخیص اختصاصی از ۱۵۰ نمونه مایع نخاع ۹ مورد نیسریا مننژیتیدیس تأیید گردید. در حالی که کشت باکتریولوژیک تنها در ۶ مورد نیسریا مننژیتیدیس را نشان داد ولی مشاهده لام مرطوب وجود ۸ مورد مننگوکک را تأیید نمود.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد، روش‌های مولکولی PCR یگانه و چندگانه برای تشخیص عامل مننژیت باکتریایی از کشت باکتریولوژیک و نیز مشاهده مستقیم از حساسیت بیشتری برخوردار است. با این حال، قضاوت بر اساس مشاهده میکروسکوپی هر چند کیفی است. ولی مشاهده مستقیم مرفولوژی باکتری و نیز سایر شواهد در نمونه مایع نخاع علاوه بر راهنمایی جهت طراحی پروتکل مناسب تشخیص قطعی و امکان انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب را جهت درمان نیز فراهم می‌نماید.

کلید واژه‌ها: مایع نخاع، مننژیت باکتریایی، تشخیص سریع و MultiplexPCR

مقدمه:

مننژیت باکتریایی یکی از عفونت‌های تهدید کننده حیات انسان در تمام سنین است و در صورتی که به‌موقع تشخیص داده نشود و به‌طور مناسب درمان نگردد؛ پیامد آن غیر قابل جبران است(۱، ۲ و ۳). هر چند کشت باکتریولوژیک و جدا سازی عامل بیماری از مایع نخاع از دقیق ترین روش‌های تشخیص بشمار می‌آید ولی به ۱۸ تا ۲۴ ساعت زمان نیاز دارد. به‌علاوه مصرف آنتی بیوتیک مانع رشد و جدا سازی باکتری می‌گردد (۴). از طرفی بنا به‌دلایل متعدد، تعداد کمی از موارد مننژیت باکتریال با این روش قابل تشخیص است (۵). روش‌های تشخیص مولکولی پیشرفته از جمله PCR هر چند مفید ولی بنا به دلایل متعدد از جمله هزینه بالا و دانش فنی مورد نیاز برای بسیاری از آزمایشگاه‌ها امکان پذیر نیست (۶). به‌طور

مرسوم، مشاهده میکروسکوپی نمونه مایع نخاع رنگ شده با روش گرم امکان تشخیص اولیه را مهیا کرده است ولی تعداد کم باکتری در نمونه، تجربه فردی وحساسیت کم و نیز وجود الیاف پروتئینی در مایع نخاع از ارزش این روش نیز کاسته است. در هر حال حساسیت هر یک از این روش‌ها بین ۶۰ تا ۹۰ درصد گزارش شده است (۷ و ۸). و حساسیت مجموع آنها ۷۵ درصد تخمین زده می‌شود. هدف این تحقیق مقایسه روش مولکولی MultiplexPCR با روش‌های باکتریولوژیک و نیز مشاهده مستقیم مایع نخاع جهت تشخیص سریع عوامل شایع باکتریایی منتژیت می‌باشد.

مواد و روش ها:

در این تحقیق، محیط کشت پایه تریپتیکیز سوی‌آگار، و نیز تایر مارتین آگار بر اساس دستورالعل کارخانه سازنده تهیه و پس از استریل کردن آنها با اتوکلاو ۱۲۱ درجه سانتی گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه، در شرایط کاملا آسپتیک: افزودنی‌هایی به‌این قرار به‌آنها اضافه شد: سرم گوساله به‌نسبت ۵ درصد؛ سیستئین هیدروکلراید به‌نسبت ۰/۰۲ درصد؛ عصاره مخمر به‌نسبت ۵ گرم در لیتر؛ گلوکز منوهیدرات ۵ گرم در لیتر.

پس از کنترل عدم آلودگی، محیط‌ها در یخچال ۵ تا ۱۰ درجه سانتی گراد قرار داده و در موقع لزوم استفاده گردید. برای تهیه محیط کشت شوکولاتی، به‌محیط فوق، پس از استریل نمودن آن و در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به‌نسبت ۱۰ درصد خون دفیبرینه گوسفند اضافه شد.

جمع آوری نمونهCSF و بررسی باکتریوژیک آنها

از مهر ماه ۱۳۸۳ لغایت مهر ۱۳۸۵، تعداد ۱۵۰ نمونه مایع نخاع بیمار مبتلا به‌منتژیت مراجعه کننده به‌بیمارستان‌های مورد نظر در تهران توسط پزشک متخصص جمع آوری شد پس از تهیه لام مستقیم (لام مرطوب و اسمیر رنگ شده) و نیز کشت باکتریولوژیک در محیط‌های روتین و نیز در محیط‌های اختصاصی، قسمتی از نمونه‌های ارسالی را به‌آزمایشگاه تحقیقاتی منتقل و مورد بررسی بیشتر قرار گرفتند. به‌این ترتیب، از هر نمونه یک اسمیر مرطوب و یک اسمیر خشک تهیه شد. اسمیر مرطوب مستقیماً با عدسی ۱۰۰ بررسی گردید. اسمیر خشک را رنگ‌آمیزی ساده (بلودو متیلن) و نیز رنگ‌آمیزی گرم انجام و با دقت و حوصله مورد بررسی قرار گرفت. به‌طوری که هر لام حداقل ۱۰ دقیقه تحت بررسی قرار داشت. در صورتی که در لام مستقیم سلول پلی مورف یا باکتری مشاهده نمی‌شد. نمونه را به‌مدت ۵ دقیقه با دور g × ۱۰۰۰۰ و دمای آزمایشگاه سانتریفیوژ و از رسوب آن کشت باکتریولوژیک انجام و اسمیر نیز تهیه و بررسی می‌شد(۹).

انتخاب پرایمر

پس از بررسی منابعی که از PCR برای تشخیص عوامل شایع منتژیت باکتریایی 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 نیسریا منتژیتیدیس، استرپتوکوکوس پنومونیه و هموفیلوس اینفلونزا را شناسایی کرده بودند، انتخاب گردید. همچنین، پرایمر عمومی که بر اساس ژن محافظت شده *16S rRNA* انتخاب و مورد بررسی قرار گرفتند (۱۰، ۱۱). بر اساس میزان حساسیت و اختصاصیت پرایمرها و نتایج آنالیز آنها با نرم افزار ملکولی BLAST کارآیی پرایمرها تعیین گردید. به این ترتیب پرایمرهایی با ترادف های مشخص انتخاب (جدول ۱) و مورد بررسی قرار گرفت. این پرایمرها توسط شرکت سیناژن ساخته شد.

جدول۱: ترادف پرایمرهای عمومی و اختصاصی استفاده شده در این تحقیق

PRIMER	position 16srRNA sequence of E.coli(region)	(Sequence 5'-3')
U3	۵۰۹-۵۳۳	AACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
NM	۸۳۱-۸۴۷	TGTTGGGCAACCTGATTG
HI	۹۹۸-۱۰۱۵	CCTAAGAAGAGCTCAGAG
STREP	۱۲۴۶-۱۲۶۳	GTACAACGAGTCGCAAGC
U8	۱۵۴۱-۱۵۱۷	AAGGAGGTGATCCAGCCGCAGGTTC

استخراج ژنوم: برای استخراج ژنوم از روش Boom و همکاران با کمی تغییر بهره گرفته شد (۱۲و ۱۳). بهاین ترتیب که برای set up نمودن آزمایش PCR ابتداء چند کلنی از باکتری‌های استاندارد را به۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژی وارد نموده و سانتریفیوژ گردید (۵۰۰۰ دور بهمدت ۵ دقیقه)، بهروسوب حاصل ۵۰۰ میکرولیتر بافر Salt Tris EDTA افزوده و پس از ۱۰ دقیقه و مخلوط نمودن آن، ۱۸۰ میکرولیتر SDS دو درصد بهآن اضافه گردید. پس از آن ۳۷۵ میکرولیتر استات سدیم بهآن افزوده و ۱۰ بار تکان شدید داده شد. سپس در ٤ درجهسانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و بهمحلول رویی ۷۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه و بهمدت ۲۰ دقیقه در یخچال منهای ۲۰ درجه نگهداری و پس از آن سانتریفیوژ گردید (۱۵۰۰۰ دور بهمدت ۲۰ دقیقه و دمای ٤ درجهسانتی‌گراد). بهروسوب حاصل ۳۷۵ میکرولیتر اتانل ۷۰ درصد افزوده و بهخوبی مخلوط گردید و بهمدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. بهروسوب حاصل ۲۵ میکرولیتر بافر TE اضافه کرده و جهت انجام PCR استفاده شد.

بهینه سازی مواد لازم برای واکنش PCR

برای رسیدن بهاین هدف چند بار فرآیند PCR با ژنوم سویه‌های استاندارد انجام شد و در هر مرحله یکی از غلظت‌های مواد اولیه (پرایمرها ،MgCl2، dNTP و آنزیم Taq پلی مراز) استفاده شد و در نهایت مناسب‌ترین مقادیر مواد لازم برای انجام PCR انتخاب گردیدند. دمای اتصال پرایمرها، پروفایل‌های حرارتی و زمان واکنش تغییر داده شد تا بهترین شرایط PCR فراهم گردد. جهت بهینه سازی دمای اتصال پرایمرها (Annealing) از درجه حرارت‌های ٥٦ ، ٥٧ و ٥٨/٨ ، ٥٩/٩ ، ٦١/٢ ، ٦٢/٧ ،٦٣/٢ درجه سانتی‌گراد استفاده شد (۱۴).

انجام PCR نمونه‌های CSF

پس از استخراج ژنومی از نمونه‌های مایع نخاع بیماران مبتلا بهمننژیت 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 گردید. روش تعیین مقدار DNA بر اساس میزان حساسیت رنگ اتیدیوم بروماید: با توجه بهاین که توانایی روش الکتروفورز در رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در تعیین DNA در بهترین شرایط یک نانوگرم می‌باشد (۱۵). لذا نمونه خالص شده از محیط کشت بهصورت رقت سریالی ۱/۲ تا ۱/۸۰رقیق گردید و ضعیف ترین باند انتخاب شد.

یافته ها:

نتایج مشاهده مستقیم نمونه‌های مایع نخاع در لام مرطوب و لام رنگ شده

طی دو سال؛ یعنی از مهرماه ۱۳۸۳ لغایت مهرماه ۱۳۸۵ مجموعاً ۱۵۰ نمونه مایع نخاع بیماران با علایم مننژیت بهمراکز اورژانس بیمارستان‌های مورد نظر ارجاع شد و از نظر مولکولی و باکتریولوژیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، مشاهده لام مستقیم تهیه شده از مایع نخاع بیمار مبتلا بهمننژیت، چه بهصورت مرطوب و چه بهصورت رنگ شده؛ سلول‌های باکتری و نیز سلول‌های پلی‌مورف قابل مشاهده هستند.

نتایج کشت باکتریولوژیک

تلقیح ۱۰۰ میکرولیتر از مایع نخاع با کدورت قابل مشاهده و یا رسوب حاصل از سانتریفیوژ بهمحیط‌های آگار شوکولاتی با پایه مولر هینتون و نیز تاریر مارتین تقویت شده با خون گوسفند یا سرم گوساله، گلوکز، عصاره مخمر و نیز سیستئین هیدروکلراید و گرمخانه‌گذاری در شرایط ۵ – ۳ درصد گاز کربنیک و دمای ۳۷ – ۳٦ درجه سانتی‌گراد، پس از ٢٤ ساعت در مقایسه با سایر محیط‌ها با رشد مطلوب همراه بود. آنالیز نتایج کشت باکتریولوژیک نشان داد از ۱۵۰ نمونه مایع نخاع بررسی شده ٤٣ مورد کشت مثبت باکتریولوژیک تأیید گردید. فراوانی باکتری‌های جدا شده به ترتیب شامل: *Streptococcus pneumoniae* و سایر کوکوسی‌های گرم مثبت (۵۰ درصد)، *Neisseria meningitidis* (۱۱ درصد)، *Haemophilus influenzae* و سایر باکتری‌های گرم منفی (۳۹ درصد) بود.

نتایج بررسی مولکولی

پس از set up کردن روش Multiplex PCR با سویه‌های استاندارد باکتریایی، مناسبت‌ترین غلظت از مواد مصرفی و پروفایل حرارتی بهقرار جدول ۲ و ۳ حاصل گردید.

جدول ۲: مواد مصرفی استاندارد شده مورد نیاز برای انجام Multiplex PCR

Materials	Amount	Final Concentration
dNTP(10 mM)	۰,۷µl	۰,۳۵mM
Primer NM/HI/STREP (20pmol) (Forward)	۰,۸µl	۰,۸µM/L
PrimerU8 (20pmol) (Reverse)	۰,۸µl	۰,۸µM/L
MgCl2 (50 mM)	۰,۸µl	۲ mM
Template(PCR product of U3&U8 genomes *Neisseria meningitides/ Haemophilus influenzae / Streptococcus pneumoniae*)	۱ µl	۱ µl (Concentration 1/1000 of Primery pcr product)
Taq DNA Polymerase (500U)	۰,۷µl	۱,۷۵U
Buffer (10x)	۱,٦ µl	۰,۸x
D.W	۱۳,۶µl	--
Total	۲۰ µl	

جدول۳: پروفایل حرارتی استاندارد شده مورد استفاده

Stage	*Temperature(C °)*	*Time*	*Cycle*
HEAT Denaturation	۹٤	٦Min	۱
Denaturation	۹٤	٦Min	۲٦
Anealing	٦۳	٦Min	
Extention	۷۲	٦Min	
FINAL Extention	۷۲	٦Min	۱

با توجه به اپتیمایز کردن روش مولکولی، نتایج بررسی‌های باکتریولوژیک، مشاهده مستقیم و نیز PCR ۱۵۰ نمونه CSF از نظر موارد منتژیت ناشی از *Neisseria meningitidis* در جدول ٤ خلاصه شده است. چنانچه نشان داده شده است. ۵ نمونه CSF با نتیجه کشت منفی، با PCR از نظر نیسریا منتژیتیدیس مثبت گزارش شد. این در حالی است که تنها ۱ مورد از ۵ مورد در مشاهده مستقیم لام رنگ آمیزی شده با روش گرم مثبت گزارش شد اما با مشاهده لام مرطوب (Wet mount) ، ۸ مورد مثبت گزارش شد.

جدول ٤: نتایج کشت، مشاهده مستقیم و PCR ۱۵۰ نمونه مایع نخاع از نظر منتژیت منگوکوکوسی

شمارهٔ نمونه	مشاهده مستقیم با لام مرطوب	مشاهده لام رنگ‌آمیزی شده	نتیجه کشت باکتریولوژیک	نتیجه واکنش PCR
۱	+	+	+	+
۲	+	+	+	+
۳	+	+	+	+
۴	+	+	+	+
۵	+	+	+	+
۶	+	+	–	+
۷	+	–	–	+
۸	+	–	–	+
۹	–	–	–	+
۱۰	-	-	-	+

از نظر تشخیص باکتری‌های *Streptococcus pneumoniae* و *Haemophilus influenzae* با روش مولکولی و مقایسه آن با کشت باکتریولوژیک و مشاهده مستقیم نتایجی مشابه جدول ۴ حاصل گردید. در مجموع استفاده از روش مولکولی جهت تشخیص عوامل باکتریایی مننژیت حاکی از آن بود که استفاده از پرایمرهای ارایه شده در جدول ۱ وجود سه عامل مهم باکتریایی، یعنی؛ *Neisseria meningitidis* ، *Streptococcus pneumoniae* و *Haemophilus influenzae* در بیش از ۳۰ درصد موارد کشت منفی، وجود ژنوم باکتریایی در نمونه‌های مایع نخاع تأیید گردید.

بحث :

در این تحقیق که در خلال دو سال انجام شد. ۱۵۰ نمونه مایع نخاع از بیماران با محدوده سنی ۱٦ تا ۷۵ سال بررسی گردید. با بهینه سازی محیط کشت، در ٤۳ مورد (۲۸/٦ درصد) رشد باکتری (انواع باکتری گرم مثبت و گرم منفی) مثبت و ۱۰۷ موردکشت منفی گزارش گردید. در حالی که با PCR در ۶۷ مورد از نمونه‌های مایع نخاع افراد مبتلا به مننژیت وجود ژنوم باکتری تأیید و در ۸۳ مورد وجود ژنوم باکتری تأیید نشد. بر اساس مشاهده مستقیم لام مرطوب ۵۲ مورد وجود باکتری تایید گردید. به‌علاوه بر اساس لام رنگ آمیزی گرم در ٤۸ مورد از نمونه‌های مایع نخاع وجود باکتری اثبات گردید. هر چند در لام مستقیم امکان تشخیص نوع باکتری وجود ندارد ولی در هر حال تایید کننده اتیولوژی باکتریایی و راهنمای مناسبی برای شروع قطعی درمان ضد باکتریایی است. از بین باکتری‌های جدا شده تنها ۵ مورد نایسریا منژیتیدیس جدا گردید. این درحالی است که در لام مرطوب ۸ مورد و در لام رنگ آمیزی گرم در ٦ مورد وجود نایسریا اثبات گردید. در حالی که بکار بردن پرایمر اختصاصی نایسریا منژیتیدیس و انجام PCR وجود ۱۰ مورد نایسریا در نمونه‌های مایع نخاع تشخیص داده شد. هر چند نمی‌توان با این تعداد نمونه به‌طور قطع قضاوت نمود ولی این نتایج بدان معناست که استفاده از روش‌های مولکولی حساس تر و دقیق تر از روش‌های مرسوم باکتریولوژیک است. به‌علاوه استفاده از دانش فنی افراد و بکار بردن لام مرطوب بر حساسیت تشخیص‌های باکتریولوژیک می‌افزاید. به‌این ترتیب امکان انتخاب مناسب درمان برای پزشک بیشتر می‌گردد. در حال، حاضر منابع معتبر میکروب‌شناسی بر مشاهده مستقیم نمونه‌های باکتریولوژیک تأکید می‌نمایند (۱۶)، این در حالی است که در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی بالینی کمتر به این امر توجه شده است. چنانچه نتایج این تحقیق نشان داد، استفاده از لام مرطوب (قطره معلق) ۱۰ درصد بیش از نتیجه کشت باکتریایی تأیید کننده مننژیت است. در این خصوص سرعت عمل بالا در مدت زمانی اندک حداکثر ۱۰ دقیقه از مزایای تشخیصی بسیاری برخوردار است. افزون براین، در سال‌های اخیر استفاده از روش‌های تشخیص سریع و پیشرفته از جمله: Multiplex PCR و RT- PCR امکان تعیین اتیولوژی و نیز انتخاب آنتی بیوتیک در فاصله زمانی حدود ۳ تا ۴ ساعت مهیا شده است(۱۷). این امر هم برای پزشک و هم برای بیمار بسیار ارزشمند است. اما باید درنظر داشت، امکان بکار گیری روش‌های پیشرفته فوق برای تمام مراکز درمانی مقرون به‌صرفه نیست. لذا، استفاده از تکنیک مشاهده مستقیم و تهیه لام مرطوب (دیدن قطره معلق) تشخیص احتمالی مننژیت باکتریال را امکان پذیر می‌سازد. در هر حال، طی ۱۵ سال گذشته، پیشرفت‌های زیادی در زمینه تشخیص مولکولی عفونت‌های باکتریایی گزارش شده است (۱۸و ۱۹).

نتیجه گیری :

نتایج حاصل از کاربردهای روش‌های مولکولی هر چند رضایت‌بخش اما با تفاوت‌هایی همراه بوده است. دلایل متعددی برای آن ذکر شده است. یکی از مهم‌ترین آنها حساسیت فوق‌العاده روش‌مولکولی است. بنابراین وجود آلودگی در جریان عمل از دیگر موارد نامطلوب برای این روش است. در این تحقیق، تلاش همه‌جانبه‌ای انجام شد تا از بروز آلودگی نمونه‌ها در جریان عمل ممانعت به‌عمل آید. با این‌حال نمی‌توان آلودگی پرایمرها و نیز آنریم تک‌پلی‌مراز را نادیده گرفت. با وجود این در این تحقیق امکان تعیین آلودگی این مواد وجود نداشت. به‌علاوه پژوهشگران از پرایمرهای مختلف و تعداد چرخه‌های متفاوت برای انجام PCR استفاده کرده‌اند که می‌تواند دلیل مهمی برای این تغییرات باشد. این امر ضرورت انجام تحقیق بیشتری را طلب می‌کند.

فهرست مراجع:

1- Geiseler PJ, Nelson KE, Levin S, Reddi KT, and Moses VK. Community-acquired purulent meningitis: a review of 1316 cases during the antibiotic era, 1954–1976. *Rev Infect Dis* 1980; **2**:725–745.

2- Gorse GJ, Thrupp LD, Nudleman KL, Wyle FA, Hawkins B, and Cesario T C. Bacterial meningitis in the elderly. *Arch Intern Med* 1984; **144**:1603–1607.

3- Swartz MN, and Dodge PR. Bacterial meningitis—a review of selected aspects. *N Engl J Med* 1965; **272**:725–730.

4- Stroffolini T. Vaccination Campaign against meningococcal disease in army recruitsin Italy. *Epidemiol Infect* 1990; **105(3)**: 579– 583.

5- Gooya MM, Zahrai SM, Shirazi MR, and Nahid P. Information and Statistics of Contagous Diseases in Iran (1977 – 2002). 1st vol. Diseases Center. Seda publication, 2004 pp: 133-210.

6- Khwannimit B, Chayakul P, and Geater A. 2004. Acute bacterial meningitis in adults: a 20 year review. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2004;**35(4)**:886-892.

7- La Scolea L, and Dryja D. Quantitation of bacteria in cerebrospinal fluid and blood of children with meningitis and its diagnostic significance. *J Clin Microbiol* 1984; **19**:187–190.

8- Phillips SE, and Millan JC. Reassessment of microbiology protocol for cerebrospinal fluid specimens. *Lab Med* 1991; **22**: 619–622.

9- Gray L, and Daniel FP. Laboratory Diagnosis of Bacterial Meningitis. *Clin Microbiol Rev* 1992; **5(2):** 130- 145.

10- Radstrom P, Backman A, Qian N, Kragsbjerg P, Pahlson N, and Olcen 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* 1994; **32(11):** 2738- 2744.

11- JihLu J, LihPerng C, Yilee S, and Chieng wan C. use of PCR with universal primer and restriction endonuclease digestion for detection and identification of common bacterial pathogens in CSF. *J Clin Microbiol* 2000; **38(6):** 2076- 2080.

12- Sambrook J. & David RW. Molecular cloning a laboratory manual. Gold Spring harbor laboratory press. 3rd ed. 2001;Vol 1. pp: 544 .

13- Boom R, Sol C J A, Salimans M M M, Jansen C L, Wertheim-van M E D, and Noordaa J van der. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *J Clin Microbiol* 1990; **28(3):** 495- 503.

14- Stralin K, Backman A, Holmberg H, Fredlund H, Olcen P. Design of a multiplex PCR for *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydophila pneumoniae* to be used on sputum samples. *APMIS* 2005; **113**:99–111.

15- Tzanakaki G, Tsopanomichalou M, Kesanopoulos K, Matzourani R, Sioumala M, Tabaki A, and Kremastinou J. Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* type b and Streptococcus pneumoniae. *Clin Microbiol Infect* 2005; **11**: 386–390.

16- Forbes, AB, Sahm FD, and Weissfield SA. Bailey & Scotts Diagnostic Microbiology. 11th ed. Mosby inc. Printed in the United State of Anerica, Philadephia, 2002; PP: 1069.

17- Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter E A, *et al.* Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; **19(1)**: 165–256.

18- Speers DJ**.** Clinical Applications of Molecular Biology for Infectious Diseases. *Clin Biochem Rev* 2006; **27**: 39-51.

19- Wolcott MR. Advances in Nucleic Acid-Based Detection Methods. *Clin Microbiol Rev* 1992; **5(4):** 370- 386.