● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌وسوم، شمارهٔ ۳، ص ۳۴۳-۳۳۴، ۱۳۹۵

مقالهٔ پژوهشی

شناسایی نایسریا منتژیتیدیس در بیماران مشکوک به منتژیت در بیمارستان امام رضای (ع) شهر کرمانشاه در سال ۱۳۹۳

علیشا اکیا[۱]، کمال احمدی[۲*]، بیژن نعمانپور[۳]

خلاصه

مقدمه: نایسریا منتژیتیدیس (Neisseria meningitidis) باکتری سخت رشد و از عوامل اصلی منتژیت و سپسیس حاد می‌باشد که درمان مناسب آن، به تشخیص صحیح و به موقع بستگی است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی عفونت نایسریا منتژیتیدیس در نمونه‌های مایع مغزی- نخاعی (Cerebrospinal fluid یا CSF) بیماران مشکوک به منتژیت بود.

روش: در مطالعه حاضر، نمونه‌های مایع مغزی- نخاعی ۱۹۸ نمونه بیمار مشکوک به منتژیت با استفاده از روش Real-time PCR (Real-time polymerase chain reaction) و پرایمر اختصاصی ژن ctrA منتگوکوک با طول ۱۱۰ جفت باز (bp) مورد بررسی قرار گرفت. اطلاعات بیماران و همچنین، داده‌های تجزیه مایع مغزی- نخاعی نیز جمع‌آوری شد.

یافته‌ها: میانگین سنی بیماران مورد بررسی، ۲۵/۳ ± ۳۲/۱ سال بود. در کل، نمونه ۷ بیمار (۳/۵ درصد) با میانگین سنی ۲۸/۲ ± ۴۴/۰ سال از نظر عفونت منتگوکوک مثبت اعلام شد که به ترتیب دارای میانگین پروتئین و گلوکز ۳۹/۸۶ و ۴۱/۸۶ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود. در نمونه‌های مثبت، میانگین تعداد گلبول‌های سفید (*White blood cells* یا WBC)، ۵۰۰۹ و میزان سلول *Polymorphonuclear* در نمونه‌های مثبت شده، ۷۶/۵ درصد بود.

نتیجه‌گیری: بیشترین موارد مثبت عفونت منتگوکوک، در بیماران مرد میان‌سال و بالاترین شیوع منتژیت باکتریال در فصل زمستان تشخیص داده شد. به نظر می‌رسد که روش‌های مرسوم کشت، فاقد حساسیت کافی برای شناسایی این باکتری در نمونه‌های مایع مغزی- نخاعی باشد، اما تکنیک‌های مولکولی نظیر Real-time PCR، روش‌هایی دقیق، سریع و حساسی برای تشخیص منتگوکوک در مایع مغزی- نخاعی است. یافته‌های سیتولوژی و بیوشیمیایی نمونه‌های مایع مغزی- نخاعی نیز می‌تواند سرنخ با ارزشی در تشخیص منتژیت باکتریایی فراهم کند.

واژه‌های کلیدی: منتژیت باکتریال، Real-time polymerase chain reaction، منتگوکوک

۱- دانشیار، گروه میکروب‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات عفونت‌های بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران ۲- کارشناس ارشد، گروه میکروب‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران ۳- استادیار، گروه میکروب‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

* **نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک:** kamalrokh1990@gmail.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۲/۲۷ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۹۴/۶/۱ **پذیرش مقاله:** ۱۳۹۴/۶/۲۱

مقدمه

منتژیت، التهاب و عفونی شدن پرده‌های اطراف مغز و طناب نخاعی است که به وسیله میکروارگانیسم‌های مختلفی مانند باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها، انگل‌ها و سایر عوامل ایجاد می‌شود. در این میان، باکتری‌ها باعث ایجاد شدیدترین شکل منتژیت می‌شوند (۱). نایسریا منتژیتیدیس (Neisseria meningitidis) دیپلوکوک، گرم منفی و پاتوژن انسانی و از عوامل ایجاد کننده بیماری‌های عفونی در سراسر دنیا به شمار می‌رود (۲). اگرچه این باکتری در بعضی از اماکن شلوغ منجر به بروز اپیدمی‌های عفونت منگوکوکی می‌گردد، اما در بیشتر اوقات باعث منتژیت و سپتیسمی به صورت تک‌گیر می‌شود (۳). منگوکوک از عوامل اصلی ایجاد کننده منتژیت باکتریال و همچنین، عامل ۸۰ تا ۹۵ درصد از اپیدمی‌های این بیماری در سنین مختلف در بیشتر جوامع است (۴). میزان شیوع منتژیت گزارش شده به وسیله این باکتری در حدود ۱ تا ۱۲ مورد در هر ۱۰۰ هزار نفر از جمعیت در نواحی مختلف دنیا است که این نسبت در اپیدمی‌های آن افزایش می‌یابد (۵).

طبق مطالعات انجام شده، میزان مرگ و میر ناشی از منتژیت منگوکوکی حدود ۹ تا ۴۰ درصد و همچنین، میزان عوارض پایدار نورولوژیک حاصل از آن در افراد زنده مانده از این بیماری، حدود ۱۹ درصدگزارش شده است (۶). تأخیر در تشخیص و به دنبال آن درمان نامناسب، می‌تواند باعث افزایش تلفات و عوارض پایدار آن شود (۷). روش‌های مرسوم شناسایی و تشخیص، بر پایه کشت و خصوصیات فنوتیپی باکتری است (۸)، اما این روش‌ها با وجود ارزان و در دسترس بودن، به علت زمان‌بر و طاقت‌فرسا بودن که در بعضی موارد به حداقل ۱ تا ۲ روز زمان نیاز دارند، از حساسیت پایینی برخوردار هستند. حتی در صورت مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها قبل از نمونه‌گیری، حساسیت این روش‌ها به علت استریل شدن مایع مغزی-نخاعی (Cerebrospinal fluid یا CSF) در فاصله زمانی کوتاهی بعد از مصرف، باز هم به میزان زیادی کاهش می‌یابد. از دیگر محدودیت‌های روش‌های رایج تشخیص، می‌توان به تأخیر زمانی قبل از انجام کشت باکتریایی و حساسیت و ویژگی ضعیف شناسایی آنتی‌ژن‌های آن اشاره نمود (۱۰، ۹، ۵).

در سال‌های اخیر، بیشتر از روش‌هایی بر پایه تکثیر اسید نوکلئیک در تشخیص این میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود. از جمله این روش‌ها، روش Real-time PCR (Real-time polymerase chain reaction) است که سرعت و دقت بالاتری نسبت به روش PCR معمولی دارد. از جمله مزایای این سیستم نسبت به روش‌های PCR مرسوم، می‌توان به سرعت در رسیدن به نتایج نهایی، کاهش آلودگی نمونه‌ها در حین آنالیز آن‌ها و به خصوص تعیین بار کمی میکروبی و در نتیجه، حساسیت و ویژگی بالاتر آن اشاره کرد (۱۱، ۹). مطالعات مختلف مشخص کرده‌اند که روش‌های مولکولی دارای توانایی بالایی نسبت به سایر روش‌ها، در تشخیص و شناسایی عوامل این بیماری می‌باشند (۱۳، ۱۲). با استفاده از این روش‌های جدید می‌توان در فاصله زمانی کوتاهی، عوامل مختلف این بیماری را حتی به صورت چندگانه شناسایی کرد و به دنبال آن می‌توان با انتخاب داروهای مناسب علیه آن‌ها، از مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک و بروز مقاومت‌های دارویی و همچنین، تحمیل هزینه‌های اضافی بر بیماران جلوگیری کرد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی عفونت‌های احتمالی نایسریا منتژیتیدیس در CSF بیماران پذیرش شده مشکوک به منتژیت باکتریال در بیمارستان امام رضای (ع) شهر کرمانشاه بود.

روش بررسی

نمونه‌های CSF: در این مطالعه، ۱۹۸ نمونه CSF در فاصله زمانی سال ۹۳-۱۳۹۲ از بیمارانی که از نظر کلینیکی در

بیمارستان امام رضای (ع) شهر کرمانشاه مشکوک به منتژیت منینگوکوکی بودند، اما نتایج کشت CSF آن‌ها منفی گزارش شده بود، مورد بررسی مولکولی قرار گرفت. نمونه‌های CSF جمع‌آوری شده در شرایط استریل در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شد و تا زمان استخراج DNA در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. موارد خروج از مطالعه شامل نمونه‌های CSF با حجم خیلی کم بود.

استخراج DNA: از نمونه‌های CSF، هر کدام به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴ دقیقه سانتریفوژ شد و از رسوب باکتری حاصل، جهت استخراج DNA به وسیله کیت CinnaPure (محصول شرکت سیناکلون، ایران) بر طبق دستورالعمل آن استفاده گردید. DNA استخراج شده تا قبل از انجام آزمایش مولکولی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

واکنش Real-time PCR: از قطعه ژنی ctrA با طول ۱۱۰ جفت بازی (bp) و با سکانس ژنی F: GCTGCGGTAGGTGGTTCAA و R: TTGTCGCGGATTTGCAACTA که به عنوان قطعه اختصاصی برای نایسریا منتژیتیدیس در مطالعات مختلف گزارش شده بود (۹)، استفاده گردید. پرایمرها توسط شرکت سیناکلون ایران ساخته شد. واکنش Real-time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، شامل ۶ میکرولیتر Master Mix-EvaGreen (شرکت سیناکلون، ایران)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر، ۱۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه و در نهایت ۳ میکرولیتر از DNA الگو بود. این واکنش در دستگاه Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Australia) و با شرایط دمایی واسرشت ابتدایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ دقیقه و در ادامه ۴۵ سیکل شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۶۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه انجام گرفت و میزان جذب فلوروسانس برای رنگ سبز در این مرحله انجام شد. به همراه نمونه‌های بیماران، ۵ نمونه استاندارد منینگوکوک، به عنوان کنترل مثبت از غلظت سریالی 10^{1} تا 10^{5} کپی در میلی‌لیتر با کنترل منفی در هر مرحله از واکنش استفاده شد. در هر مرحله بر اساس E (Efficiency) برابر با ۵ /۰ ± ۱/۰۲، اگر میزان R و R2 کمتر از ۰/۹۷۵بود، تست تکرار می‌گردید.

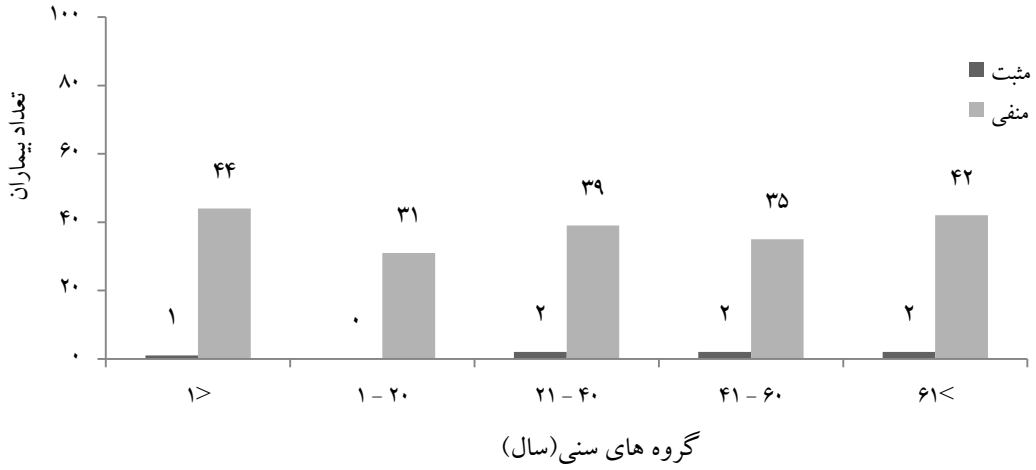
تعیین اختصاصیت واکنش Real-time PCR: برای این منظور، ژنوم باکتری‌های مختلف از جمله کوکسی‌های گرم مثبتی مانند استافیلوکوک اورئوس (PTCC۱۱۸۹)، انتروکوک فکالیس (PTCC۱۲۳۷)، استرپتوکوک آگالاکتیه (PTCC۱۷۶۸)، استرپتوکوک پیوژنز (PTCC۱۴۴۷)، استرپتوکوک پنومونیه (PTCC۱۲۴۰) و باسیل‌های گرم منفی از جمله اشرشیاکلی (PTCC۱۳۹۵)، کلبسیلا پنومونیه (PTCC۱۰۵۳)، سودوموناس آئروژینوزا (PTCC۱۳۱۰)، هموفیلوس آنفلوانزا (PTCC۱۷۶۶)، سالمونلا تیفی (PTCC۱۶۰۹) و باسیل‌های گرم مثبت مثل لیستریا مونوسیتوژنز (PTCC۱۲۹۷) که از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شده بودند، به وسیله کیت CinnaPure DNA (شرکت سیناکلون، ایران) بر طبق دستورالعمل شرکت استخراج گردید و با آن‌ها واکنش Real-time PCR انجام گرفت که نتیجه تمامی این واکنش‌ها منفی گزارش شد.

تعیین حساسیت آنالیتیکال واکنش: برای این منظور، از ژنوم نایسریا منتژیتیدیس (ATCC۱۳۰۹۰) استفاده شد. پس از کشت ۲۴ ساعته باکتری بر روی محیط Chocolate agar با روش کدورت‌سنجی McFarland ۰/۵ و کدورت تقریبی 10^{8} × ۱/۵ واحد تشکیل دهنده کلونی (Colony-forming units یا CFU) بر میلی‌لیتر و همچنین، بررسی با اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر، ۵ رقت سریالی از 10^{1} تا 10^{5} برای رسم منحنی استاندارد تهیه شد که جهت حساسیت واکنش و ژن ctrA استفاده گردید.

همه نتایج آزمایش‌های سیتولوژی، بیوشیمیایی و مشخصات فردی نمونه‌های مورد بررسی به همراه نتایج حاصل از آزمایش‌های مولکولی این نمونه‌ها با استفاده از آزمون‌های Independent t و Mann-Whitney در نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

نمونه‌های CSF اخذ شده از بیماران مشکوک به بیماری مننژیت که در آزمایشگاه بیمارستان از نظر روش‌های کشت باکتریایی منفی گزارش شده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. از ۱۹۸ نمونه CSF، ۹۸ مورد (۴۹/۵ درصد) متعلق به بیماران مرد و ۱۰۰ مورد (۵۰/۵ درصد) متعلق به بیماران زن بود. بیماران در محدوده سنی یک روزه تا ۹۱ ساله قرار داشتند و میانگین سنی آنان ۲۵/۳ ± ۳۲/۱ سال بود. روش Real-time PCR بر روی نمونه‌ها نشان داد که از مجموع نمونه‌های مورد بررسی، ۷ نمونه (۳/۵ درصد) دارای DNA منینگوکوک بودند. مشخصات سنی نمونه‌های مثبت و منفی در شکل ۱ آمده است.



شکل ۱. *فراوانی سنی بیماران مورد بررسی*

در بیماران میانسال با میانگین سنی ۲۸/۲ ± ۴۴/۰ سال، موارد مثبت منینگوکوک تشخیص داده شد که ۵ مورد در مردان و ۲ مورد در زنان مشاهده گردید. نتایج نمونه‌های بیماران مثبت تشخیص داده شده با روش مولکولی به همراه نتایج سیتولوژی و همچنین، بررسی کمی تعداد باکتری در واحد حجم CSF در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. *مقایسه نتایج سیتولوژی با نتایج حاصل از Real-time PCR (Real-time polymerase chain reaction) نمونه‌های مثبت شده بیماران*

جنسیت	سن (سال)	پروتئین (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	گلوکز (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	تعداد WBC	شمارش افتراقی		سیکل شروع	شمارش باکتریال (تعداد کپی در میلی‌لیتر)
					نوتروفیل (درصد)	لنفوسیت (درصد)		
مرد	۷۲	۶۵	۲۱	۱۴۰۰	۷۰	۳۰	۲۷/۳۷	۷۶۹ (۷/۶e ±۲)
مرد	۲۱	۷۵	۷	۲۵۰۰۰	۹۰	۱۰	۲۲/۹۱	۱۳۴۵ (۱/۳e ±۳)
مرد	۵۲	۲۸	۶۰	۵۰۰	۸۲	۱۸	۲۲/۸۸	۹۹۷۵ (۹/۹e ±۳)
زن	۴۰	۳۸	۴۲	۱۱۰	۶۰	۴۰	۲۸/۲	۵۵۷ (۵/۵e ±۲)
مرد	۸۲	۱۸	۷۳	۸۰۰۰	۹۲	۸	۲۴/۸۱	۱۳۶۷ (۱/۳e ±۳)
زن	۱	۲۰	۴۶	۵۰	۶۵	۳۵	۳۴/۴۶	۵۱ (۵/۱e ±۱)
مرد	۴۰	۳۵	۴۴	۵	–	–	۳۱/۲	۸۵ (۸/۵e ±۱)

e: exponential

تجزیه و تحلیل نمونه‌های مثبت شده منگوکوک در برابر موارد منفی تشخیص داده شده در جدول ۲ ارایه شده است.

جدول ۲. *تجزیه و تحلیل آماری نمونه‌های مثبت و منفی شده*

متغیر / نمونه‌ها	۷ نمونه مثبت	۱۹۱ نمونه منفی	P
سن (سال)	۴۳/۹۰	۳۱/۰۳	۰/۳۸۰
پروتئین (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	۳۹/۸۶	۲۹/۰۳	۰/۱۸۱
گلوکز (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	۴۱/۸۶	۶۱/۱۲	۰/۱۱۳
تعداد WBC	۵۰۰۹	۱۹۹/۸۰	۰/۰۰۱

WBC: White blood cells

بحث

با وجود پیشرفت‌های فراوان علم پزشکی، منژیت باکتریال هنوز هم به عنوان یکی از بیماری‌های عفونی با میزان میزان مرگ و میر بالا محسوب می‌شود. در این بیماری، خصوصیات سیتولوژی و بیوشیمیایی CSF بیماران می‌تواند یافته‌های باارزشی را در جهت تشخیص و افتراق آن از سایر انواع منژیت فراهم نماید. در میان این ویژگی‌ها، افزایش تعداد گلبول‌های سفید خون (White blood cells یا WBC)، سطح پروتئین و کاهش سطح گلوکز در CSF، سرنخ‌های مفیدی در این زمینه می‌باشد. با این وجود، این شاخص‌ها نمی‌توانند به صراحت باعث افتراق منژیت باکتریال از نوع ویروسی آن شوند (۱۵، ۱۴). هر چند در نمونه‌های مورد بررسی پژوهش حاضر، مقادیر گلوکز و پروتئین تا حدودی در طیف طبیعی قرار داشت، اما میانگین تعداد WBC (۵۰۰۹ سلول) و همچنین، میزان PMN (۷۶/۵ درصد) افزایش چشمگیری را نشان داد و از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری در این زمینه بین موارد مثبت با موارد منفی شده مشاهده گردید (P < ۰/۰۰۱). ولی

بر خلاف مطالعه بهادر و همکاران، از لحاظ معیارهایی مانند گلوکز و پروتئین، تفاوت معنی‌داری بین موارد مثبت و منفی وجود نداشت ($P > ۰/۰۵$) (۱۶) که با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی ندارد.

از جمله دلایل پایین بودن حساسیت روش‌های مرسوم شناسایی و تشخیص مننژیت باکتریال نسبت به روش‌های مولکولی، نیاز آن‌ها به حداقل ۱۰۴ تا ۱۰۶ میکروارگانیسم زنده در هر میلی‌لیتر از CSF بیماران می‌باشد (۱۸، ۱۷). در مطالعه حاضر، از روش Real-time PCR استفاده گردید. از جمله مزایای این روش نسبت به روش PCR معمولی، توانایی سنجش بار میکروبی و سرعت در دریافت نتایج آن می‌باشد. پژوهشی که برای شناسایی DNA مننگوکوک بر روی نمونه‌های CSF انجام گرفته بود، با روش PCR توانست میزان $۴/۵ \times ۱۰^{۳}$ باکتری در هر میلی‌لیتر را شناسایی کند (۱۹)؛ در حالی که در مطالعه حاضر (با روش Real-time PCR) در مجموع از ۷ مورد مثبت شده مننگوکوک، میانگین ۲×۱۰^{۳} باکتری در واحد حجم (میلی‌لیتر) شناسایی گردید. شاید یکی از دلایل بالا بودن حساسیت به دست آمده در این روش، کاهش مقدار مواد ممانعت کننده و مهار کننده در حین واکنش و همچنین، کاهش آلودگی نمونه‌ها در طول فرایند تجزیه و تحلیل آن‌ها باشد (۱۹).

مطالعات مختلفی که در سایر نقاط دنیا با استفاده از روش‌های مولکولی مختلف از جمله Real-time PCR برای شناسایی DNA مننگوکوک در نمونه‌های کشت منفی CSF صورت گرفته است، توانسته‌اند به ترتیب در ایتالیا از مجموع ۱۵ نمونه، ۵ مورد (۳۳/۰ درصد) (۲۰)، در مصر از تعداد ۲۷ نمونه، ۱۸ مورد (۶۶/۰ درصد) (۲۱) و در هلند از تعداد ۶ نمونه، ۱ مورد (۱۶/۷ درصد) (۲۲) را به عنوان مننگوکوک شناسایی نمایند. قربانزادگان و همکاران در مطالعه خود از مجموع ۱۳۰ نمونه CSF، ۶ نمونه (۴/۶ درصد) را با روش PCR جدا کردند (۲۳) که از لحاظ درصد شیوع به دست آمده با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی داشت. شاید یکی از دلایل پایین بودن درصد شیوع به دست آمده در مطالعه حاضر، کشت منفی و همچنین، زیاد بودن تعداد نمونه‌های مورد بررسی باشد، اما از لحاظ مواردی مانند شیوع فصلی مننژیت باکتریال و وقوع بیشتر آن در مردان، نتایج مشابهی با سایر مطالعات مشاهده شد.

در یکی از نمونه‌های مورد بررسی، با وجود طبیعی بودن مقادیر گلوکز، پروتئین و WBC، نتیجه Real-time PCR مثبت شد. در نتیجه، طبیعی بودن نتایج CSF در بیماران مشکوک به مننژیت، نمی‌تواند به تنهایی نشانه عدم وجود این بیماری باشد (۲۴). بیشترین موارد مثبت تشخیص داده شده در مطالعه حاضر، در افراد میانسال و با میانگین تعداد WBC بالا مشاهده گردید. افزایش بیشتر سلول‌های چند هسته‌ای در موارد مثبت، می‌تواند نشانه برخورد قبلی و فراوان آن‌ها با آنتی‌ژن‌های باکتریال باشد. در مقابل، در افراد کم سن و سال، به علت برخورد کمتر و نیز ضعیف بودن پاسخ سیستم ایمنی آن‌ها در مقابل آنتی‌ژن‌های باکتریال، افزایش کمتر گلبول‌های سفید توجیه می‌گردد.

با توجه به این که بیشترین شیوع بیماری مننژیت باکتریال در فصل زمستان است (۲۵) و در مطالعه حاضر نیز بیشترین موارد مثبت تشخیص داده شده در بیمارانی مشاهده گردید که در فصل زمستان جهت اخذ نمونه CSF در بیمارستان پذیرش شده بودند (۴ مورد)، یافته‌های تحقیق با نتایج سایر مطالعات (۲۶، ۱۶) مشابهت دارد. از لحاظ نسبت شیوع مننژیت باکتریال در دو جنس، بیشترین موارد مثبت شده در مردان نسبت به زنان (نسبت ۲/۵ مرد به زن) مشاهده شد که از این نظر با نتایج تحقیق دیگری (۲۷) سازگار بود. به دلیل پایین بودن تعداد موارد مثبت شده الگوی فصلی مننژیت باکتریال، این میزان در مطالعه حاضر از نظر آماری معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری

بیشتر موارد مثبت تشخیص داده شده منتژیت باکتریال در بررسی حاضر، در بیماران مرد میانسال و بیشترین شیوع آن، در فصل زمستان بود. نتایج پژوهش بر روی نمونه‌های منفی گزارش شده نیز نشان داد که روش Real-time PCR نسبت به روش‌های کشت معمول در بیمارستان، دارای حساسیت بالایی برای شناسایی منینگوکوک می‌باشد و از این‌رو، استفاده از چنین روشی در تشخیص منتژیت توصیه می‌شود. اگرآزمایش‌های سیتولوژی و بیوشیمیایی به خصوص شمارش افتراقی پلی‌مورفونوکلئرها و سطوح پروتئین و گلوکز نیز به درستی انجام گیرد، می‌تواند در تشخیص این بیماری ارزشمند باشد.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر حاصل پایان‌نامه دانشجویی مصوب گروه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه در سال ۱۳۹۱ با شماره ثبت ۹۱۲۱۳ می‌باشد و با حمایت مالی این دانشگاه انجام شده است.

References

1. Torpy JM, Lynm C, Glass RM. JAMA patient page. Meningitis. *JAMA* 2007; 297(1): 122.
2. Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and Neisseria meningitidis. *Lancet* 2007; 369(9580): 2196-210.
3. Ragunathan L, Ramsay M, Borrow R, Guiver M, Gray S, Kaczmarski EB. Clinical features, laboratory findings and management of meningococcal meningitis in England and Wales: report of a 1997 survey. Meningococcal meningitis: 1997 survey report. *J Infect* 2000; 40(1): 74-9.
4. Zimba TF, Nota DT, Langa JC, Monteiro LG, Coovadia YM. The aetiology of acute community acquired bacterial meningitis in children and adults in Maputo, Mozambique. *J Infect Dev Ctries* 2009; 3(9): 723-6.
5. Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM. Meningococcal disease. *N Engl J Med* 2001; 344(18): 1378-88.
6. Manchanda V, Gupta S, Bhalla P. Meningococcal disease: history, epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, antimicrobial susceptibility and prevention. *Indian J Med Microbiol* 2006; 24(1): 7-19.
7. Richardson D, 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.
8. Abdeldaim GM, Stralin K, Korsgaard J, Blomberg J, Welinder-Olsson C, Herrmann B. Multiplex quantitative PCR for detection of lower respiratory tract infection and meningitis caused by Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae and Neisseria meningitidis. *BMC Microbiol* 2010; 10: 310.
9. 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): 1553-8.

10. Taha MK, Olcen P. Molecular genetic methods in diagnosis and direct characterization of acute bacterial central nervous system infections. *APMIS* 2004; 112(11-12): 753-70.
11. Sacchi CT, Fukasawa LO, Goncalves MG, Salgado MM, Shutt KA, Carvalhanas TR, et al. Incorporation of real-time PCR into routine public health surveillance of culture negative bacterial meningitis in Sao Paulo, Brazil. *PLoS One* 2011; 6(6): e20675.
12. Wu HM, Cordeiro SM, Harcourt BH, Carvalho M, Azevedo J, Oliveira TQ, et al. Accuracy of real-time PCR, Gram stain and culture for Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis and Haemophilus influenzae meningitis diagnosis. *BMC Infectious Diseases* 2013; 13: 26.
13. Sarookhani M, Ayazi P, Alizadeh S, Foroughi F, Sahmani A, Adineh M. Comparison of 16S rDNA-PCR amplification and culture of cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis. *Iran J Pediatr* 2010; 20(4): 471-5.
14. Reilly BM, Evans AT. Translating clinical research into clinical practice: impact of using prediction rules to make decisions. *Ann Intern Med* 2006; 144(3): 201-9.
15. Negrini B, Kelleher KJ, Wald ER. Cerebrospinal fluid findings in aseptic versus bacterial meningitis. *Pediatrics* 2000; 105(2): 316-9.
16. Bahador M, Amini M, Bahador M. Common cause and cerebrospinal fluid changes of acute bacterial meningitis. *Iranian Journal of Pathology* 2009; 4(2): 75-9.
17. Failace L, Wagner M, Chesky M, Scalco R, Jobim LF. Simultaneouds detection of Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae and Streptococcus sp. by polymerase chain reaction for the diagnosis of bacterial meningits. *Arq Neuro-Psiquiatr* 2005; 63(4): 920-4.
18. Ghotaslou R, Farajnia S, Yeganeh F, Abdoli-Oskouei S, Ahangarzadeh RM, Barzegar M. Detection of acute childhood meningitis by PCR, culture and agglutination tests in Tabriz, Iran. *Acta Med Iran* 2012; 50(3): 192-6.
19. 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): 1553-8.
20. Favaro M, Savini V, Favalli C, Fontana C. A multi-target real-time PCR assay for rapid identification of meningitis-associated microorganisms. *Mol Biotechnol* 2013; 53(1): 74-9.
21. Abdel-Salam HA. Direct PCR assay for detection of Neisseria meningitidis in human cerebrospinal fluid. Folia Microbiol (Praha) 1999; 44(6): 689-94.

22. Schuurman T, de Boer RF, Kooistra-Smid AM, van Zwet AA. Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16S ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting. *J Clin Microbiol* 2004; 42(2): 734-40.

23. Qurbanalizadegan M, Ranjbar R, Ataee R, Hajia M, Goodarzi Z, Farshad S, et al. Specific PCR assay for rapid and direct detection of Neisseria meningitidis in cerebrospinal fluid specimens. *Iran J Public Health* 2010; 39(4): 45-50.

24. Mehrabi Tavana A, Ataee A, Gouya M, Parhisgar S, Hosseini- Shokoh M, Mahmmodi Farahani M. The Effects of vaccination against meningococcal meningitis in Islamic Republic of Iran military forces during the years 1981 to 2009. *Ann Mil Health Sci Res* 2010; 8(3): 186-92. [In Persian].

25. Theodoridou M, Vasilopoulou VA, Atsali E, Pangalis AM, Mostrou GJ, Syriopoulou V, et al. Meningitis registry of hospitalized cases in children: epidemiological patterns of acute bacterial meningitis throughout a 32-year period. *BMC Infect Dis* 2007; 7: 101.

26. Kazemi-Galougahi MH, Khalilifar AH, Akbari M. A survey of meningitis in a military organization and plotting its GIS distribution. *J Military Medicine* 2013; 15(1): 1-6.

27. Mosavi-Jarrahi A, Esteghamati A, Asgari F, Heidarnia M, Mousavi-Jarrahi Y, Goya M. Temporal analysis of the incidence of meningitis in the Tehran metropolitan area, 1999-2005. *Popul Health Metr* 2009; 7: 19.

Identification of Neisseria Meningitidis in Patients with Suspected Meningitis: a Study in Imam Reza Hospital, Kermanshah City, Iran, 2013

Alisha Akya, Ph.D.[1], Kamal Ahmadi, M.Sc.[2*], Bizhan Nomanpour, Ph.D.[3]

1. Associate Professor, Department of Medical Microbiology, School of Medicine AND Nosocomial Infection Research Centre, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

2. M.Sc, Department of Medical Microbiology, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

3. Assistant Professor, Department of Medical Microbiology, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

* Corresponding author; e-mail: kamalrokh1990@gmail.com

(Received: 16 May 2015 Accepted: 11 Sep. 2015)

Abstract

Background & Aims: Neisseria meningitidis is bacteria fastidious, and the main causes of meningitis and acute sepsis. Appropriate treatment depends on accurate and timely diagnosis. This study aimed to identify Neisseria meningitidis infection in samples of cerebrospinal fluid (CSF) in patients with suspected meningitis.

Methods: In this study, 198 samples of cerebrospinal fluid of patients with suspected bacterial meningitis were assessed using real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) targeted with specific primers prepared from meningococcal ctrA gene with the length of 110 bp. In addition, the data of patients and analysis of cerebrospinal fluid were collected.

Results: The mean age of the studied patients was 32.1 ± 25.3 year. Totally, the samples of 7 patients (3.5%) with the mean age of 44.0 ± 28.2 years were positive for meningococcal infectioun with the mean protein and glucose levels of 39.86 and 41.86 mg/dl, respectively. In positive cases, the mean number of white blood cells was 5009 with the mean polymorphonuclear (PMN) value was 76.5%.

Conclusion: In this study, most of the positive cases were middle-aged men with a higher incidence rate in the winter. It seems that the traditional methods of cultivation are not sensitive enough to detect this bacterium in cerebrospinal fluid. Alternatively, the molecular techniques such as real-time polymerase chain reaction seem to be accurate, sensitive and rapid for the detection of meningococcus in cerebrospinal fluid. The cytological and biochemical findings of cerebrospinal fluid can provide valuable clues in the diagnosis of bacterial meningitis.

Keywords: Bacterial meningitis, Real-time polymerase chain reaction, Meningococcal

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2016; 23(3): 334-343