

## Aumento de la rentabilidad diagnóstica en la enfermedad meningocócica mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa

Carmen Muñoz-Almagro<sup>a</sup>, Antonio Palomeque<sup>b</sup>, Joan Roca<sup>b</sup>, Amadeo Gené<sup>a</sup>, Edgar Palacín<sup>a</sup> y Cristina Latorre<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Sant Joan de Déu. Esplugues. Barcelona.

<sup>b</sup>Servicio de Pediatría. Hospital Universitario Sant Joan de Déu. Esplugues. Barcelona. España.



**FUNDAMENTO Y OBJETIVO:** El objetivo del presente estudio fue evaluar la utilidad de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) rápida y sencilla para el diagnóstico de la enfermedad meningocócica.

**PACIENTES Y MÉTODO:** Desde enero de 1999 hasta junio de 2002 se realizó un estudio retrospectivo en 110 muestras de líquido cefalorraquídeo o plasma de 110 pacientes pediátricos atendidos en el Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona. Para la inclusión de estos pacientes en el estudio se revisó el diagnóstico de alta hospitalaria y se seleccionó a 43 pacientes con diagnóstico de enfermedad meningocócica (13 meningitis, 12 sepsis y 18 sepsis con meningitis) y 67 pacientes con otros diagnósticos que descartaban clínicamente la etiología meningocócica. Las muestras se procesaron por estudio microbiológico convencional (tinción de Gram, hemocultivo y cultivo de líquido cefalorraquídeo) y por técnica de PCR amplificando un fragmento de ADN de la secuencia de inserción IS1106 específica de *Neisseria meningitidis*.

**RESULTADOS:** La sensibilidad de la PCR en el grupo de pacientes diagnosticados clínicamente de enfermedad meningocócica fue del 93%, mientras que la sensibilidad del cultivo fue del 55,8%. En 19 pacientes las muestras se procesaron una vez instaurado el tratamiento con antibióticos betalactámicos (intervalo: 8-144 h) siendo positiva la PCR en 17 de ellos (sensibilidad del 89,4%) y el cultivo en dos (sensibilidad del 10,5%). Se detectó un falso positivo de la PCR en el grupo de pacientes en los que se descartó clínicamente la enfermedad (especificidad del 98,5%).

**CONCLUSIONES:** La PCR ensayada es una técnica rápida (duración aproximada de 5 h), sensible y específica que incrementa la confirmación microbiológica de la enfermedad meningocócica, en especial en los pacientes que han recibido tratamiento antibiótico previo.

**Palabras clave:** PCR. Enfermedad meningocócica. Pediatría. Diagnóstico.

### Diagnosis of meningococcal disease by polymerase chain reaction

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** The objective of the present study was to evaluate the application of a rapid and simple PCR technique to diagnose meningococcal disease.

**PATIENTS AND METHOD:** A retrospective study was undertaken from January 1999 to June 2002, comprising 110 samples of cerebrospinal fluid (CSF) or plasma from 110 different pediatric patients attending the Hospital Sant Joan de Déu of Barcelona. The selection of patients was based on their diagnosis at discharge: Forty three patients had a discharge diagnosis of meningococcal disease (13 meningitis, 12 sepsis and 18 sepsis with meningitis) while 67 had clinical conditions other than meningococcal disease. The samples were processed following standard bacteriological methods (Gram smear and culture) and a PCR technique designed to amplify a segment of the meningococcal insertion sequence IS1106 was performed.

**RESULTS:** Sensitivity of PCR in the group of patients with a clinical diagnosis of meningococcal disease was 93% while sensitivity of the culture was 55.8%. Samples from 19 patients were processed once treatment with  $\beta$ -lactam antibiotics had begun (range 8-144 hours), and positive PCR results were seen in 17 cases (sensitivity: 89.4%); a positive culture was observed in two cases of pre-treated patients (sensitivity 10.5%). A false positive result was detected in the group of patients with non-meningococcal disease (specificity 98.5%).

**CONCLUSIONS:** The application of this PCR permits a rapid (roughly 5 hours), specific and sensitive method that increases the microbiologic confirmation of meningococcal disease, mainly in patients who have received previous antibiotic treatment.

**Key words:** PCR. Meningococcal disease. Pediatrics. Diagnosis.

La enfermedad meningocócica es un importante problema de salud pública, siendo fundamental para un diagnóstico temprano la sospecha clínica. El diagnóstico de confirmación microbiológica requiere del aislamiento en cultivo del agente causal, *Neisseria meningitidis*, o de la visualización microscópica de diplococos gram-negativos en líquido cefalorraquídeo u otros fluidos estériles. El rendimiento de estos métodos tradicionales de diagnóstico microbiológico es limitado, en especial en los pacientes que han iniciado tratamiento antibiótico previo a la recogida de muestras para el cultivo<sup>12</sup>.

La confirmación microbiológica de todos los casos permite realizar una adecuada vigilancia epidemiológica para conocer la incidencia real de la enfermedad, el serogrupo y serotipo de las cepas implicadas y la sensibilidad a los antimicrobianos utilizados. Esta información es de gran utilidad para el clínico en el seguimiento del paciente y en el ámbito de la salud pública para establecer medidas de prevención oportunas, incluyendo la evaluación de los programas vacunales. En los últimos años diversos autores han descrito la utilidad de la técnica de amplificación molecular, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para el diagnóstico de la enfermedad meningocócica<sup>3-5</sup>. La detección del genoma de *N. meningitidis* en la muestra directa incrementa el diagnóstico de certeza y es una primera fase para continuar con estudios moleculares que permitan identificar con precisión las cepas que producen la enfermedad en nuestro ámbito.

El presente estudio evalúa la utilidad de una técnica de PCR rápida y sencilla para el diagnóstico de la enfermedad meningocócica.

### Pacientes y método

#### Pacientes

Durante el período de estudio (desde el 1 de enero de 1999 hasta el 30 de junio de 2002) se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  100  $\mu\text{l}$  de las muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) extraídas de pacientes pediátricos que habían sido procesadas en el Servicio de Microbiología del Hospital Sant Joan de Déu de Esplugues (Bar-

Correspondencia: Dra. C. Muñoz-Almagro.  
Servicio de Microbiología. Hospital Sant Joan de Déu.  
P.º Sant Joan de Déu, 2.  
08950 Esplugues. Barcelona. España.  
Correo electrónico: cma@hsjdbcn.org

Recibido el 17-10-2002; aceptado para su publicación el 11-2-2003.

celona) para cultivo bacteriano. Se trata de un hospital universitario que atiende a una población de 1.100.000 habitantes, 200.000 de ellos menores de 18 años, aunque debido a su condición de hospital de tercer nivel también atiende a pacientes de otras áreas geográficas derivados desde otros centros sanitarios.

Una vez que se disponía del diagnóstico de alta hospitalaria del paciente, se seleccionaron para su inclusión en el estudio todas las muestras congeladas con diagnóstico de enfermedad meningocócica y muestras control de pacientes diagnosticados de otros procesos patológicos.

Desde el 1 de enero de 2001 se añadieron al estudio de forma prospectiva muestras de plasma de pacientes con sospecha clínica de enfermedad meningocócica en el momento de ingresar en el hospital. Estas muestras se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  y se procesaron con el resto de muestras de LCR una vez que se conocía el diagnóstico de alta de los pacientes.

En total se incluyó a 43 pacientes (22 niños y 21 niñas), con edades comprendidas entre 3 meses y 17 años, con una media de edad de 5 años, diagnosticados al alta de enfermedad meningocócica: 13 meningitis, 12 sepsis y 18 sepsis con meningitis. Como grupo control se incluyó a 67 pacientes sin criterios clínicos de enfermedad meningocócica diagnosticados al alta hospitalaria de otras enfermedades.

En los pacientes que presentaban meningitis (con o sin sepsis) se procesó la muestra de LCR para el estudio por PCR, y en los que presentaban sólo sepsis se procesó la muestra de sangre. De los 43 pacientes con diagnóstico de enfermedad meningocócica, 24 correspondían a casos confirmados microbiológicamente por aislamiento de *N. meningitidis* en las muestras procesadas para cultivo, y los 19 restantes correspondían a casos diagnosticados por sospecha clínica en pacientes que presentaban un cuadro febril súbito con exantema tromboembólico y petequeal, en ocasiones acompañado de datos clínicos (vómitos, cefaleas, signos meníngeos, depresión sensorial) y analíticos de meningitis bacteriana y de deterioro hemodinámico<sup>6</sup>.

En todos los pacientes diagnosticados de enfermedad meningocócica se revisó la toma de antibiótico en las horas previas a la extracción de la muestra para su procesamiento por PCR y cultivo.

#### Método

Las muestras se procesaban inmediatamente para estudio microbiológico tradicional (tinción de Gram y cultivo) según procedimientos estándar<sup>7</sup>. Para el cultivo de las muestras de sangre se utilizó el sistema de detección automático Bact/Alert de Laboratorios Bio-Merieux.

#### Técnica de PCR

1. **Preparación previa de las muestras.** Las muestras de plasma se centrifugaban (centrífuga modelo Biofuge 22R de laboratorios Hereus) en el momento de su recepción durante 1 h a 25.000 g a temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . Tras la centrifugación se retiraba el sobrenadante cuidadosamente. El sedimento se resuspendía con 200  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato salino con un pH de 7,2 (PBS). Las muestras de LCR no requerían tratamiento previo.

2. **Extracción del ADN.** Se añadían a 150  $\mu\text{l}$  de una solución de resina Chelex 100 al 20% (DNA extracción Reagent<sup>®</sup>, Laboratorios Perkin Elmer) 50  $\mu\text{l}$  de LCR o de la suspensión del plasma en PBS. Tras practicar vórtex durante 10 s se incubaban a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 20 min y posteriormente a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 10 min.

3. **Amplificación.** Se seleccionaron los iniciadores y condiciones de amplificación descritos previamente por Newcombe et al<sup>8</sup>, 5'-ATTATTCAGACCGCCG-CAG (posición 850-869) y 5'-TGCCGTCCTGCAACT-GATGT (posición 1161-1141), que amplifican un fragmento del ADN de 331 pb de la secuencia de inserción IS1106 específica de *N. meningitidis*.

Se añadían 20  $\mu\text{l}$  del extracto de ADN a 80  $\mu\text{l}$  de mezcla maestra (PCR ELISA DIG labeling<sup>®</sup>, Boehringer Mannheim) que contenía 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM de dATP, 0,2 mM de dCTP, 0,2 mM de dGTP, 0,19 mM de dTTP y 0,01 mM de DIG-dUTP, 0,5  $\mu\text{M}$  de cada

primer y 2,5 U de Taq polimerasa. La amplificación, que se realizaba en un termociclador 9600 (Laboratorios Perkin Elmer), consistía en 32 ciclos de desnaturalización a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 25 s, anillamiento de los primers a  $61^{\circ}\text{C}$  durante 40 s y extensión a  $72^{\circ}\text{C}$  durante 60 s. El ciclo final incluía una extensión a  $72^{\circ}\text{C}$  durante 7 min.

4. **Detección por hibridación colorimétrica.** Se utilizó el kit PCR ELISA DIG detection<sup>®</sup>, de Boehringer Mannheim, utilizando como sonda de captura la sonda biotinilada: 5'-GTACCGATGCGGAAGGCTAT (posición 1001-1020)<sup>7</sup>.

Se añadían al producto amplificado 100  $\mu\text{l}$  de solución de desnaturalización de ADN y se incubaba 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, 50  $\mu\text{l}$  del producto amplificado desnaturalizado se añadían a cada pocillo de la microplaca que contenía 200  $\mu\text{l}$  de buffer de hibridación con la sonda biotinilada a una concentración de 7,5 pm/ml. La hibridación se realizaba a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 90 min con agitación intermitente. Después de la hibridación los pocillos eran lavados 5 veces y se añadían 200  $\mu\text{l}$  de solución antidigoxigeninperoxidasa incubándose a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. Se realizaba una segunda serie de 5 lavados y se añadían 200  $\mu\text{l}$  de solución de sustrato ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, diammonium salt) con posterior incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 min.

La lectura de resultados se realizó con el lector de densidad óptica (OD) para microplacas (Microplate reader 2001, BioWhittaker) a 405 nm (OD 405) con un filtro de referencia de 492 nm.

Se consideró que el resultado era positivo cuando las absorbancias eran superiores a 0,250 OD (siguiendo instrucciones del fabricante); resultado negativo cuando las absorbancias eran inferiores a 0,200 OD, y resultado indeterminado cuando las absorbancias se situaban entre 0,200 y 0,250 OD.

Esta técnica duraba aproximadamente 5 h (extracción: 25 min; amplificación: 90 min y detección: 180 min).

**Preparación de controles.** Como controles positivos se utilizaron 15 muestras con cultivo positivo para *N. meningitidis* y como controles negativos agua destilada y 8 muestras con cultivo positivo para microorganismos distintos de *N. meningitidis* (dos *Streptococcus agalactiae*, tres *Staphylococcus aureus*, un *Streptococcus faecalis*, un *Streptococcus faecium* y una *Klebsiella pneumoniae*).

Para la medida de la sensibilidad del método, se inocularon en 1 ml de PBS colonias aisladas de un cultivo de 24 h de *N. meningitidis* serogrupo B aislada en nuestro laboratorio, ajustándose a la concentración 0,25 McFarland, que equivale aproximadamente a  $7,5 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias (UFC)/ml. A partir de este inóculo se realizaron diluciones seriadas 1/100, sembrándose 100  $\mu\text{l}$  de cada dilución en placa de recuento para comprobar la concentración bacteriana. Las diluciones con concentraciones de 75, 7,5 y 0,75 UFC/ $\mu\text{l}$  se amplificaron como muestras.

#### Análisis estadístico

Los datos se introdujeron y conservaron en una base de datos computerizada (Microsoft Access; Microsoft, EE.UU.). Se calcularon la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la técnica de PCR tomando como referencia el diagnóstico clínico de alta hospitalaria. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de la  $\chi^2$  cuando se cumplían las condiciones para su aplicación; en caso contrario, se usó la prueba exacta de Fisher.

#### Resultados

El estudio de sensibilidad de la PCR demostró que esta técnica podía amplificar hasta 0,75 UFC por  $\mu\text{l}$  (15 UFC por reacción de amplificación).

Se detectó genoma de *N. meningitidis* en 41 pacientes: en 10 muestras de plasma de los 12 pacientes con sepsis meningocócica y en 30 muestras de LCR de los

31 casos de meningitis meningocócica. La única paciente con detección de genoma positivo sin diagnóstico de enfermedad meningocócica en el momento del alta había sido diagnosticada de sepsis bacteriana por *Streptococcus pyogenes* en el contexto de una varicela. La muestra procesada por PCR fue el LCR, y se detectó una densidad óptica de 0,373. El aislamiento de *S. pyogenes* se detectó en una muestra de líquido pleural, siendo negativos los cultivos de sangre y LCR.

Todas las muestras con cultivo positivo para *N. meningitidis* o con visualización de diplococos gramnegativos en la tinción de Gram fueron positivas por PCR. De los 12 pacientes con diagnóstico de sepsis meningocócica, el hemocultivo en nuestro centro fue positivo en tan sólo uno de ellos. Es de destacar que en 11 de estos pacientes tanto la PCR como el cultivo se realizó en muestras extraídas una vez iniciado el tratamiento antibiótico con betalactámicos, con un intervalo de tiempo de tratamiento de 4 a 72 h y una media de 21 h. El cultivo del LCR fue positivo en 23 de los 30 pacientes con meningitis (sensibilidad del 76,6%), y se visualizaron diplococos gramnegativos en la tinción de Gram en 14 de ellos (sensibilidad del 46,6%). Ocho de los 30 pacientes habían iniciado tratamiento antibiótico con betalactámicos, con un intervalo de 8 a 144 h, y una media (DE) de 48 (66,9) h. En estos 8 pacientes tanto la tinción de Gram como el cultivo fueron positivos en dos muestras.

El resto de las muestras, tanto las de cultivo positivo a otros patógenos diferentes de *N. meningitidis* como las de cultivo negativo en las que se descartó la etiología meningocócica, fueron a su vez negativas por PCR, excepto la muestra comentada anteriormente. Globalmente la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la PCR respecto al total de las muestras estudiadas fueron del 93% (40 de 43 muestras), del 99% (66 de 67 muestras), del 98% (40 de 41 muestras) y del 96% (66 de 69 muestras), respectivamente. Comparando la sensibilidad de la PCR (93%) con la del cultivo (55%), se observó un incremento del diagnóstico microbiológico del 37,2%. Esta diferencia entre el cultivo y la PCR para el diagnóstico de la enfermedad meningocócica es estadísticamente significativa  $p < 0,05$ , como se observa en la tabla 1, donde se expone la sensibilidad del cultivo y de la PCR respecto del diagnóstico clínico de enfermedad meningocócica diferenciando los resultados según la exposición a betalactámicos en las horas previas.

En la figura 1 se representa la distribución de los resultados de densidad óptica obtenidos en el total de muestras procesadas.

## Discusión

Presentamos los resultados obtenidos con una técnica de PCR rápida y sencilla que, mediante una lectura objetiva de los resultados, ha permitido aumentar en un 37% la confirmación microbiológica de los casos diagnosticados sólo por sospecha clínica. Este incremento es similar al 35% de Taha<sup>9</sup> y al 31% de Newcombe et al<sup>8</sup>. Debido a que nuestro hospital es centro de referencia en cuidados intensivos pediátricos, un elevado número de pacientes había iniciado en su hospital de origen el tratamiento específico contra *N. meningitidis* horas o incluso días antes del procesamiento de las muestras para cultivo y PCR. Esta administración de betalactámicos previa al ingreso en el hospital contribuye de forma notable a dismi-

nuir los casos confirmados por cultivo<sup>10</sup>. La enfermedad meningocócica es una urgencia médica que requiere de tratamiento antibiótico y soporte vital temprano para evitar la posibilidad de lesiones irreversibles que pueden llevar a la muerte del enfermo en pocas horas. Disponer de la técnica de PCR descrita permite confirmar con buena sensibilidad (83,3% para las muestras de plasma y del 96,7% para el LCR) el diagnóstico clínico aun con exposición a tratamiento durante períodos prolongados. Indudablemente, a mayor exposición al tratamiento, la sensibilidad debería reducirse por descenso de la carga bacteriana. Hackett et al<sup>11</sup> demuestran mediante una técnica de PCR cuantitativa que las cargas bacterianas más elevadas se encuentran en los pacientes más graves, que admiten menos

demora en el inicio del tratamiento. Este hecho podría justificar la buena sensibilidad obtenida en los pacientes tratados. El fragmento de ADN seleccionado para su amplificación (IS1106) es una secuencia de inserción que se encuentra de forma repetida en el genoma de casi todos los meningococos. Borrow et al<sup>12</sup> describen falsos positivos aplicando esta secuencia; la posibilidad de falsos positivos podría deberse a que las secuencias de inserción son genéticamente móviles y tienen la habilidad de poder expandirse entre bacterias de distintos géneros o incluso especies. Para valorar la especificidad de la técnica, procesamos 67 muestras sin relación con *N. meningitidis* y encontramos un falso positivo, por lo que la especificidad en nuestra serie fue del 98,5%. Otros autores, como Carrol et al<sup>13</sup>, no encuentran falsos positivos con esta misma diana. La aplicación de esta PCR se plantea como una primera fase de cribado que nos permite identificar con elevada sensibilidad el genoma de *N. meningitidis*. Una vez identificadas las muestras positivas, se podría continuar aplicando otras técnicas de tipificación molecular más específicas que permitan clasificar y relacionar las cepas que producen la enfermedad en nuestro medio.

Una importante limitación que suelen presentar los diagnósticos basados en la PCR es la laboriosidad de la técnica, en especial en la fase de extracción del ADN a partir de muestras con fuerte presencia de inhibidores, como es el caso de la sangre periférica. El sistema de extracción del ADN a partir de sangre periférica que presentamos destaca por su sencillez y buen rendimiento en los resultados. La ultracentrifugación a 25.000 g del plasma permite la precipitación del posible agente infeccioso, lo que incrementa la sensibilidad de la técnica. La baja temperatura en la centrifugación es necesaria para evitar el calentamiento de la muestra durante la rotación, lo que implicaría una degradación no deseada del ADN. Una vez preparado el plasma, el hervido posterior con Chelex-100 permite obtener un ADN de alta calidad con mínima manipulación de la muestra.

En conclusión, esta técnica de PCR, rápida y sencilla, es una prueba útil, sensible y específica, complementaria al cultivo, que incrementa el diagnóstico de certeza de esta enfermedad, en especial en los pacientes que han recibido tratamiento antibiótico previo.

TABLA 1

**Resultados del cultivo y de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el grupo de pacientes diagnosticados clínicamente de enfermedad meningocócica**

Diagnóstico clínico	N.º de pacientes	Diagnóstico microbiológico		
		Resultados positivos (sensibilidad [%])		
		Cultivo	PCR	p
Sepsis meningocócica	12	1 (8,3)	10 (83,3)	0,001 <sup>a</sup>
Expuestos a tratamiento con betalactámicos	11	0 (0)	10 (90,9)	0,0001 <sup>a</sup>
No expuestos a tratamiento con betalactámicos	1	1 (100)	1 (100)	—
Meningitis meningocócica	31	23 (76,6)	30 (96,7)	0,02 <sup>b</sup>
Expuestos a tratamiento con betalactámicos	8	2 (25)	7 (87,5)	0,04 <sup>b</sup>
No expuestos a tratamiento con betalactámicos	23	21 (91,3)	23 (100)	NS <sup>b</sup>
Total global	43	24	40	

NS: no significativo ( $p > 0,05$ ). <sup>a</sup>Prueba exacta de Fisher; <sup>b</sup>prueba de la  $\chi^2$ .

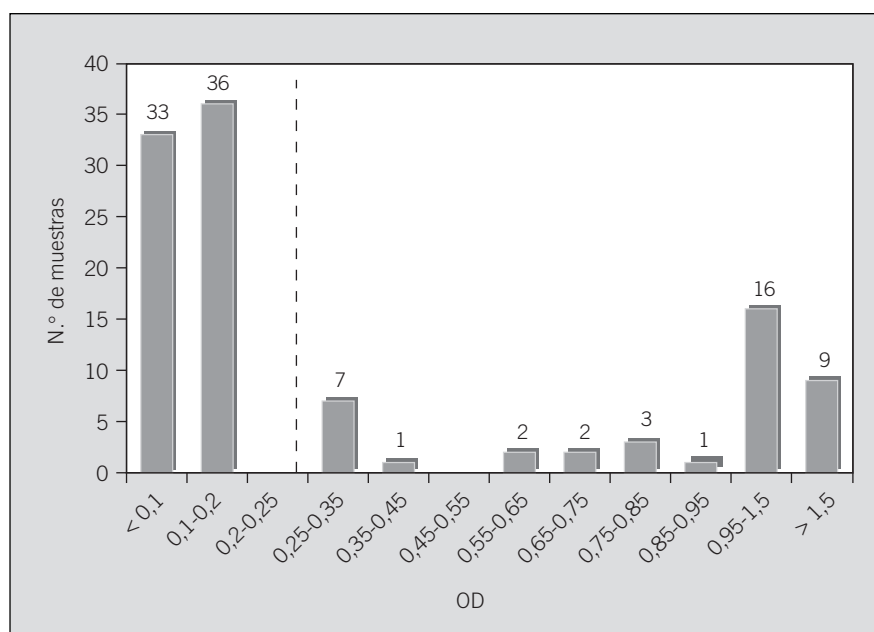


Fig. 1. Resultados de densidad óptica (OD) de la detección del ADN de *Neisseria meningitidis* en el total de muestras procesadas. La barra vertical en línea discontinua indica el valor mínimo de OD (0,250) para considerar un resultado positivo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cartwright K, Reilly S, White D, Stuart J. Early treatment with parenteral penicillin in meningococcal disease. *BMJ* 1992;305:143-7.
- Beni C, Cayla JA, Jansa JM, Maldonado R, Pannella H, Rajmil L, et al. Enfermedad invasiva por

- Haemophilus influenzae* tipo b y enfermedad meningocócica: incidencia y características en Barcelona, 1994-1995. Med Clin (Barc) 1999; 112:1-4.
3. Glustein JZ, Zhang Y, Wadowsky RM, Ehrlich GD. Development of a simplex polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Neisseria meningitidis*. Mol Diagn 1999;4:233-9.
  4. Saunders NB, Shoemaker DR, Brandt BL, Zollinger WD. Confirmation of suspicious cases of meningococcal meningitis by PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 1997;35:3215-9.
  5. Ni H, Knight AI, Cartwright K, Palmer WH, McFadden JJ. Polymerase chain reaction for diagnosis of meningococcal meningitis. Lancet 1992;340:1432-4.
  6. Pan American Health Organization. Case definitions: meningococcal disease and viral meningitis. Epidemiological Bull 2001;24:14-6.
  7. Knapp JS, Koumans EH. *Neisseria* and *Brahmella*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. Manual of clinical microbiology. 7<sup>th</sup> ed. Washington DC: ASM Press, 1999; p. 586-604.
  8. Newcombe J, Cartwright K, Palmer W, McFadden JJ. PCR of peripheral blood for diagnosis of meningococcal disease. J Clin Microbiol 1996; 34:1637-40.
  9. Taha M-K. Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification of *Neisseria meningitidis*. J Clin Microbiol 2000;38:855-7.
  10. Wylie PA, Stevens D, Drake W III, Stuart J, Cartwright K. Epidemiology and clinical management of meningococcal disease in West Gloucestershire: retrospective, population based study. BMJ 1997;315:774-9.
  11. Hackett SJ, Guiver M, Marsh J, Sills JA, Thompson APJ, Kaczmarski EB, et al. Meningococcal bacterial DNA load at presentation correlates with disease severity. Arch Dis Child 2002;86: 44-6.
  12. Borrow R, Guiver M, Sadler F, Kaczmarski EB, Fox AJ. False positive diagnosis of meningococcal infection by the IS1106 PCR ELISA. FEMS Microbiol Letter 1998;162:215-8.
  13. Carrol DE, Thomson APJ, Shears P, Gray SJ, Kaczmarski EB, Hart CA. Performance characteristics of the polymerase chain reaction assay to confirm clinical meningococcal disease. Arch Dis Child 2000;83:271-3.