

Neisseria gonorrhoeae detection through Real-Time PCR in asymptomatic patients

Filipiuc Silvia¹, Ursu Ramona Gabriela², Iancu C. Luminița Smaranda^{2,3}

1. Public Health Authority Suceava, Microbiology Laboratory
2. University of Medicine and Pharmacy „Gr. T. Popa” Iași, Faculty of medicine, Microbiology Discipline
3. Regional Center of Public Health Iași

Contact details: LS Iancu: Public Health Authority Suceava, Microbiology Laboratory

University of Medicine and Pharmacy „Gr. T. Popa” Iași, Faculty of Medicine, Microbiology Discipline, Faculty of Medicine, 16 Independenței Av, 700115, Iași, Romania, 0232 301752, 0232 211829, luminitasmaranda@yahoo.com

The study has been carried out at University of Medicine and Pharmacy „Gr. T. Popa” Iași, Faculty of Medicine, Microbiology Discipline, 16 Independenței Av, 700115, Iași, Romania

First name, middle initials and surname of the authors, without any scientific, didactic or military degrees; full name of the working-place (institution and department) for each author; contact details of the corresponding author (full address, telephone number, fax number, e-mail address) and the address of the institution and department where the study has been carried out. Contact details will be published unless otherwise requested by the author.

Abstract

Purpose: the study tested for the first time in Romania *Neisseria gonorrhoeae* infections in women with chronic pelvic inflammatory diseases (CPID), using Real Time PCR in order to improve the sensitivity of diagnosis.

Methods and procedures

100 patients diagnosed with CPID were tested in the period September 2010 - March 2011. The patients average age was 32 years old (limits 22 - 68).

An automated Real Time PCR kit was used (Primer Desing) using as sample endocervical swabs.

Result: 11 patients were detected as positive for *N. gonorrhoeae* infection, 11% respectively.

Conclusion: the study is the first from the country that test *N. gonorrhoeae* infection in women having a CPID in their past.

Even RT PCR is an expensive method, the sensibility and specificity of the technique allow a rapid identification of gonococcus in order to treat the infection according with susceptibility spectrum of *N. gonorrhoeae* isolated in our area in the previous months.

Key words: *Neisseria gonorrhoeae*, Real-Time PCR.

Abstract page.

The **abstract** should have no more than 250 words and describe briefly the purpose of the study, methods and procedures used, the most important results, main conclusions, new aspects and importance of the study. **Key words** (at least 3) according to *Index medicus*.

The text of original papers will be organized in: introduction (no more than 25% of the text), material and methods, results, comments or discussions and acknowledgements. **Material and methods** have to be described in enough detail to permit reproduction by other teams. The same product names should be used throughout the text (with the brand name in parenthesis at the first use). **Results** should be presented concisely. Tables and figures should not duplicate text. The **discussion** should set the results in context and set forth the major conclusions of the authors. Information from the Introduction or Results should not be repeated unless necessary for clarity. The discussion should also include a comparison among the obtained results and other studies from the literature, with explanations or hypothesis on the observed differences, comments on the importance of the study and the actual status of the investigated subject, unsolved problems, questions to be answered in the future. In addition to the customary recognition of non-authors who have been helpful to the work described, the **acknowledgements** section must disclose any substantive conflicts of interest.

Material and methods

De descries lotul pe scurt

Tehnica (Ramona)

In the period between September 2010 - March 2011 we invited to participate in one *Neisseria gonorrhoeae* prevalence study women with CPID in their past. All the study participants have signed the informed consent approved by the Bioethical Committee of "Grigore T. Popa" University of Medicine and Pharmacy, Iasi. The 100 samples were detected in 5 work sessions.

We collected endocervical swabs from each women and we purified the DNA / *N. gonorrhoeae* with *PrimerDesign Precision™ Gram Negative Bacterial DNA extraction* kit. The detection of gonococci was assed with 2 x Precision TM Mastermix, PrimerDesign™ genesig Kit for Gonorrhoeae (*N. gonorrhoeae*) and MX3005P instrument (*STRATAGENE*).

The *N. gonorrhoeae*'s specific primers and probes mix can be detected through the FAM channel. The primers and probes mix provided exploits the TaqMan principle. During PCR amplification, forward and reverse primers hybridize to the *N. gonorrhoeae* DNA/cDNA. A fluorogenic probe is included in the same reaction mixture which consists of a DNA probe labeled with a 5'-dye and a 3'-quencher. During PCR amplification, the probe is cleaved and the reporter dye and quencher are separated. The resulting increase in fluorescence can be detected on real-time PCR platforms.

Preparation of standard curve dilution series was performed using the positive control in dilution from $2 \times 10^6/\mu\text{l}$ up to 2 copies / μl . Pathogen detection mix contained: 10 μl 2 x Precision TM Master Mix, 1 μl Pathogen Primer/Probe mix, 4 μl RNA se / DNase free water: the final volume was 15 μl . Endogenous ACTB detection mix contained: 10 μl 2 x Precision TM Master Mix, 1 μl Endogenous ACTB Primer/Probe mix , 4 μl RNA se / DNA se free water. 15 μl of each of this two mixes was pipetted into each well according to real-time PCR experimental plate set up. 5 μl of diluted DNA wad added into each well, according with the experimental plate set up. Amplification Protocol supposed one cycle for enzyme activation – 10 minutes / 95 ° C and the 50 cycles each one with one denaturation step – 10 s / 95° C and one for data collection using FAM channel - 60 s / 60 ° C.

Results

All the controls (negative, positive controls, internal extraction control and ACTB – control for a good sampling) were validated. Also, the parameters of the standard curves for all 5 work sessions were in the accepted limits.

The prevalence of *Neisseria gonorrhoeae* in our study was 11%.

Discussion:

Studiile care au utilizat diverse sisteme Real Time PCR pentru a evalua prevalența infecției cu *Neisseria gonorrhoeae* au detectat diverse valori (tabel VI), variind între 0.006% și 19%.

Tabel VI: Prevalența *N. gonorrhoeae* evaluată cu diferite sisteme RT PCR (6, 8, 11, 12, 19, 20, 23, 27, 33, 34, 37)

Nr. crt	Prevalenta gonococ	An publicare	Tara	Autor	Sistemul RT PCR utilizat
1	0,006	2011	Elvetia	Sakem B	Abbott Diagnostics
2	0,2	2011	Spania	Corbeto EL	<i>in house</i>
3	16,7	2010	USA	Gaydos CA	Abbott RealTime CT/NG
4	1.7	2010	Anglia	Hopkins MJ	Roche COBAS Taqman CT
5	17,	2008	Norvegia	Hjelmevoll SO	<i>in house</i>
6	0,84	2008	Austria	Schabereiter-Gurtner C	COBAS AMPLICOR
7	38	2007	USA	Mangold KA	COBAS Amplicor

	16	2007	Rusia	Shipitsyna E	Real-time nucleic + (NASBA)
8	30	2005	Olanda	Geraats-Peters CW	COBAS AMPLICOR
9	3	2004	Australia	Whiley DM	TaqMan-ABI7500
10	19	2004	Australia	Whiley DM	<i>in house</i>

Deși pretul pentru detecția *N. gonorrhoeae* /probă, prin sistemul RT PCR / Taq Man este ridicat (440 RON), avantajul utilizării acestei metode este reprezentat de sensibilitatea și specificitatea metodei, în comparație cu metodele clasice de diagnostic. Un alt avantaj al acestei metode este timpul scurt în care se poate detecta prezența gonococului (maxim 4 ore de la recoltare: extracție ADN, amplificare RT PCR), în comparație cu metodele clasice (24 – 48 ore).

Pe parcursul anilor, mulți autori au trecut de la utilizarea metodelor RT PCR *in house* la utilizarea de sisteme automate RT PCR. În cele ce urmează redăm câteva din design-urile acestor studii care au evaluat caracteristicile tehnicilor Real Time PCR utilizate.

Autori din Norvegia (Hjelmevoll SO, 2008) au recunoscut faptul că utilizarea testelor de amplificare a acizilor nucleici poate crește sensibilitatea diagnosticării infecției cu *N. gonorrhoeae*, în comparație cu metoda de cultivare *in vitro*. Dezavantajul acestor metode însă este constă în faptul că speciile de *Neisseria* sunt foarte apropiate genetic, ceea ce poate conduce către la rezultate fals pozitive. Autorii și-au propus validarea clinică a unei metode Real Time PCR care a țintit pseudogena *porA* a *N. gonorrhoeae*, în prin comparație cu tehnicile de cultivare. Au fost analizate în total 360 de probe (uretrale, rectale, faringiene, cervicale), atât de la bărbați cât și de la femei, prin RT PCR și prin cultivare. 37 / 360 probe au fost pozitive prin ambele metode, iar tehnica PCR a identificat alte 15 probe pozitive. Tehnica PCR a demonstrat o sensibilitate, specificitate, valoare predictivă pozitivă și negativă de 100% în populația selectată. Pentru populația testată a avut o prevalență a gonoreei a fost de 17,4%. Procentul ridicat se explică prin selectarea cazurilor din grupe de risc pentru BTS. Autorii au concluzionat că tehnica Real Time PCR a reprezentat este o tehnică utilă pentru testarea infecției cu gonococ, în special din probe extragenitale cum ar fi cele provenite de la nivelul faringelui sau rectului (19).

Și în Rusia diagnosticul infecției gonococice a ridicat diferite probleme parcurs mai multe etape. Până în 2009, autorii menționează că diagnosticul infecțiilor cu *N. gonorrhoeae* s-a bazat pe microscopie și uneori pe metode de cultivare care s-au dovedit însă suboptimale. În ultimii ani însă au fost implementate metode de testare ale acizilor nucleici specifici gonococului, ca tehnică de rutină. Autorii (Shipitsyna E et al, 2009, Rusia) și-au propus evaluarea performanțelor a 6 metode de testare a acizilor nucleici amplificați pentru detecția *N. gonorrhoeae*. Au fost testați 496 pacienți simptomatici utilizând 5 metode de PCR clasic și o metodă RT PCR, din probe genitale, primul jet de urina și din probe extragenitale. Ca metodă de referință a fost utilizată o metodă Real Time PCR validată la nivel internațional. Metodele de testare ale acizilor nucleici utilizate în Rusia au demonstrat un nivel mare de

concordanță cu metoda de referință (99,4 – 100). Sensibilitățile, specificitățile, valorile predictice pozitive și negative au fost: 66.7-100%, 100%, 100%, și respectiv 99.4-100%. Chiar dacă performanțele testelor de evaluare ale acizilor nucleici sunt bune, se impun studii de amploare, iar rezultatele ar trebui să fie validate la nivel internațional (14). Explicația prevalenței crescute a infecției gonococice în studiul citat (16%) se explică prin faptul că lotul supus testării prin cele 6 metode s-a referat la cazuri simptomatice.

Un alt grup de cercetători, din Marea Britanie, (Hopkins MJ et al, 2010) a încercat să valideze o metodă Real Time PCR pentru detecția *N. gonorrhoeae* din urină. Tehnica utilizată a fost una de tip quadriplex (LDQA - *eveloped quadruplex assay*), ale cărei rezultate au fost apoi comparate cu rezultatele obținute cu metoda Roche COBAS Amplicor NG, ca test de confirmare. Performanța metodei care a utilizat LDQA a fost monitorizată în paralel, prin diagnostic clasic, respectiv prin cultivarea probelor recoltate cu tamponul, pe medii de cultură. LDQA a demonstrat o specificitate înaltă pentru izolatele de *N. gonorrhoeae*. Un audit care a urmat acestui studiu, a calculat o sensibilitate de 96,9% și o specificitate de 99,8% pentru detectarea gonococului, când au fost utilizate genele *porA*, *OPA* și *ADNr*, în comparație cu rezultatele obținute prin cultivarea probelor. În urma acestui studiu, dat fiind că metoda LDQA a fost identificată ca fiind o metodă eficientă de detecție a ADN a *N. gonorrhoeae*, în probele de urină, cultivarea bacteriilor a fost înlocuită cu protocoalele PCR pentru *screeningul* gonoreei prin metode de biologie moleculară (12). Remarcăm prevalența redusă a infecției gonococice în Marea Britanie, comparativ cu România, cel mai probabil prin utilizarea pe scară largă a *screening-ului* pentru BTS, ca și consecință a strategiilor de limitarea a HIV infecției.

Studiul prezentat în acest capitol reprezintă o premieră, deoarece în baza de date PubMed nu am întâlnit nicio referință bibliografică referitoare la testarea prevalenței infecției gonococice la asimptomatici, utilizând trusele de la PrimerDesing. Singurele referințe, din 2003 și 2005 se referă la testarea infecției meningococice (Jordens JZ, 2005; Whiley DM, 2003) (30, 31).

În 2010, Pope CF și colaboratorii au evaluat Performanța metodei *Becton Dickinson ProbeTec GC Q(x)* realizată cu platforma *BD VIPER*, pentru a verifica dacă sunt necesare testele de confirmare în practică. Valoarea predictivă pozitivă a fost determinată prin compararea rezultatelor culturii cu un test de confirmare care a utilizat acizii nucleici specifici *Neisseria gonorrhoeae*, utilizând probe genitale și extragenitale (rectale și faringiene). Din 14223 probe genitale au fost detectate pozitive 149 (1,0%) utilizând tehnica *GC Q(x)* realizată cu platforma *BD VIPER*; dintre acestea, 141 au fost confirmate și prin Real Time PCR sau prin cultivare. Intervalul de confidență de 95% pentru valoarea predictivă pozitivă a sugerat că nu este necesară confirmarea probelor genitale cu rezultate pozitive (9).

Un alt studiu realizat în Australia (2010) a investigat performanța sistemului automat *Cobas 4800 CT/NG* pentru detecția *Chlamydia trachomatis* și a *Neisseria gonorrhoeae*. testând 900 probe. Rezultatele obținute au fost comparate cu cele obținute utilizând tehnologia *Roche COBAS AMPLICOR CT/NG* și metoda *COBAS TaqMan CT*. Probele pozitive pentru gonococ au fost în continuare testate printr-o metodă RT PCR *in house*. Sensibilitatea, specificitatea, valoarea predictivă pozitivă și respectiv negativă pentru *N. gonorrhoeae* a fost de: 100%, 99.4%, 100% și respectiv 90.0%. Toate izolatele pozitive pentru *N. gonorrhoeae* au fost confirmate prin RT PCR, și, prin urmare, sistemul *4800 CT/NG* este indicat pentru testarea în masă a pacienților pentru detectarea infecțiilor determinate de *C. trachomatis* și *N. gonorrhoeae* (10).

Un studiu multicentric (Gaydos CA și colab., USA, 2010) a avut ca scop evaluarea performanțelor caracteristice metodei *Abbott RealTime CT/NG*, o metodă RT PCR multiplex, pentru detecția simultană a *Chlamydia trachomatis* și a *Neisseria gonorrhoeae*. Probele testate au inclus 3832 produse recoltate din 16 regiuni diferite. Probele au fost testate cu metodele *Abbott RealTime CT/NG*, *Aptima Combo 2 (Gen-Probe)*, *ProbeTec ET CT/GC (Becton Dickinson)* și cultivare pentru *N. gonorrhoeae*. Metodele *Aptima Combo 2*, *ProbeTec*, și cultura pentru gonococ au fost utilizate ca metode de referință. Pentru a declara un pacient pozitiv, acesta a fost testat și prin testele de referință. Sensibilitatea și specificitatea prin metoda *Abbott RealTime CT/NG* pentru *N. gonorrhoeae* a fost 96.9% și respectiv 99.7%. Prin comparație, sensibilitatea detecției gonococului utilizând metoda *Aptima Combo 2* au fost 96.1% și 99.5%, iar cele obținute cu ajutorul metodei *ProbeTec ET* au fost 92.0% și 97.3%. Sistemul *Abbott RealTime CT/NG* oferă posibilitatea detecției *N. gonorrhoeae* cu o sensibilitate și o specificitate ridicată. De asemenea, un alt avantaj al acestor metode este faptul că asigură o alternativă utilă de amplificare a acizilor nucleici pentru laboratoarele clinice cât și pentru clinicieni (11). Prevalența infecției cu *N. gonorrhoeae* a fost 3.8%.

Implementarea diferitelor metode de *screening* a *N. gonorrhoeae* în Anglia, utilizând teste de amplificare a acizilor nucleici a ridicat probleme legate de posibilele erori ale diagnosticului (Alexander S, 2011). Pentru a crește valoarea predicției pozitive au fost recomandate utilizarea testelor de confirmare pentru probele detectate pozitive. Autorii au examinat rezultatele utilizării a două strategii diferite de confirmare a statusului probelor examinate, metoda utilizată inițial fiind *ProbeTec Strand Displacement Amplification (SDA) (Becton Dickinson)*. Un număr de 227 de probe au fost trimise către confirmare prin două metode: *in-house* real-time PCR (pentru genele *opa* și *porA*) și examinarea cu metoda *APTIMA Combo 2 (AC2)* și cu testul *APTIMA Monospecific N. gonorrhoeae (AGC) tests (Gen-Probe)*. Din 113 probe pozitive prin tehnica SDA (inclusiv probele cu semnal scăzut pozitiv) au fost confirmate doar 93% din probele verificate, cu una sau cu ambele metode de confirmare, bazate pe principiul Real Time PCR. Toate probele detectate inițial ca negative au fost confirmate ca fiind negative utilizând testele RT PCR. Metoda ACG a confirmat doar 34% din probele inițial detectate pozitive. În concluzie, nu se pot compara rezultatele obținute cu două metode de diagnostic, datorită platformelor diferite utilizate. Deși 93% este o rată mare de confirmare a infecției, utilizând metode RT PCR independente, se impune stabilirea unei metode RT PCR *in house* standardizate, pentru a putea fi utilizată în diagnosticul de primă intenție, în mai multe laboratoare, sau ar trebui ca aceste probe să fie trimise spre confirmare în laboratoarele de referință (7).

Tehnica Real Time PCR poate fi utilizată de asemenea pentru detecția rezistenței *N. gonorrhoeae* la antibiotice. În 2006, Vernel-Pauillac F / Franta a remarcat rapidă creștere a rezistenței gonococului la penicilină și, prin urmare, se impune urmărirea fenomenului rezistenței la antibiotice. Acesta a pus la punct o metodă Real Time PCR care a detectat o mutație a genei *ponA*. Profilul mutației obținut prin Real Time PCR a arătat o bună corelație cu *paternul* sensibilității la antibiotice obținut prin antibiograma clasică. Tehnica Real Time PCR a demonstrat o acuratețe și o reproductibilitate care a fost corespunzătoare mutației prezente la toate tulpinile de gonococ cu rezistență mediată cromozomal (16).

În 2009, Vernel-Pauillac F și colaboratorii au raportat utilizarea unui duplex Real Time PCR pentru detecția simultană a mutațiilor *gyrA* și *parC* implicate în rezistența gonococului la chinolone (*QRDRs: quinolone resistance-determining regions*). Metoda RT PCR care a utilizat tehnologia *SYBR Green* a detectat toate mutațiile QRDR, ceea ce permite identificarea tuturor genotipurilor comune. Aceasta

variantă reprezintă o metodă utilă studiilor epidemiologice de supraveghere a rezistenței la antibiotice prin RT PCR, ca instrument util sănătății publice, în vederea aplicării programelor specifice de prevenire a fenomenului de rezistență și a creșterii eficienței terapiei de primă intenție (26).

Luam din capitol citeva date

Conclusion

În concluzie:

- studiul nostru utilizează pentru prima dată în țară o metodă RT-PCR pentru detectarea infecțiilor asimptomatice de *N. gonorrhoeae*;
- prevalența infecțiilor asimptomatice, diagnosticate printr-o metodă înalt sensibilă și specifică este de 11%;
- prevalența de 11% se încadrează în datele din literatură, care semnlează valori cuprinse între 0.006% și 19 %;
- detectarea infecțiilor asimptomatice prin tehnici de biologie moleculară, deși mai scumpă, comparativ cu metodele clasice de izolare și identificare, are o eficiență superioară, ceea ce justifică utilizarea ei pentru femeile cu infecție pelvină cronică, în vederea instituirii unei terapii specifice, cunoscând profilul de rezistență la antibiotice în zona studiată, determinată prin metode fenotipice sau/și genotipice.

Abbreviations shall be preceded by the full term at their first apparition in text. A list of all used abbreviations shall be made at the end of the article.

Separate pages: tables, graphics, pictures and schemes will appear on separate pages.

Tables will have a reasonable number of rows and columns.

Please do not forget to send the tables, charts, schemes etc. in their original file format (for example, .xls files if they were created in Microsoft Excel), and not embedded in the article text file (see **Manuscript preparation** section).

References should be numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in text, tables, and legends by Arabic numerals in parentheses. References cited only in tables or figure legends should be numbered in accordance with the sequence established by the first identification in the text of the particular table or figure. The titles of journals should be abbreviated according to the style used in *Index Medicus*. Consult the list of Journals Indexed for MEDLINE, published annually as a separate publication by the National Library of Medicine. Authors are responsible for the accuracy and completeness of all references and are also responsible for ensuring that references are not used out of context.

For journal articles use the following form: authors' surnames and first names initials, article's title, the journal abbreviation according to the *Index Medicus*, year, volume, starting and ending pages of the article. If there are more than six authors, list the first six and add et al.

e.g. Zimmermann MB, de Benoist B, Corigliano S, Jooste PL, Molinari L, Moosa K, et al. Assessment of iodine status using dried blood spot thyroglobulin: development of reference material and establishment of an international reference range in iodine-sufficient children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Dec;91(12):4881-7

For books or monographs: the names of the cited chapter's authors, chapter's title, the editors, the book's or monograph's title, Editure's name and location, the year of the appearance and pages.

References:

1. *** *PrimerDesign Precision™ Gram Negative Bacterial DNA extraction handbook*;
2. *** *PrimerDesign™ genesig Kit for quantification of Gonorrhoeae (N. gonorrhoeae)*, Primer Design handbook;
3. *** *Precision™ 2X qPCR Mastermix handbook*, Primer Design LTD, handbook;
4. *** *Introduction to Quantitative PCR, Stratagene, Methods and Application Guide*;
5. Tevfik Dorak M., (editor) *Real – Time PCR, BIOS Advanced Methods, Data analysis and reporting*, pg. 39 - 62.
6. Sakem B, Michel R, Nydegger UE, Radjenovic D, Wydler M, Risch M, Risch L., Diagnostic relevance of simultaneous testing for Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae., *Infection*. 2011 Apr 27.
7. Alexander S, Coelho da Silva F, Manuel R, Varma R, Ison C., Evaluation of strategies for confirming Neisseria gonorrhoeae nucleic acid amplification tests. *J Med Microbiol*. 2011 Jul;60(Pt 7):909-12.
8. Corbeto EL, Lugo R, Martró E, Falguera G, Ros R, AVECILLA A, Coll C, Saludes V, Casabona J., [Prevalence and determining factors of acquiring C. trachomatis infection among adolescents and young adults in Catalonia]., *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011 Feb;29(2):96-101.
9. Pope CF, Hay P, Alexander S, Capaldi K, Dave J, Sadiq ST, Ison CA, Planche T., Positive predictive value of the Becton Dickinson VIPER system and the ProbeTec GC Q x assay, in extracted mode, for detection of *Neisseria gonorrhoeae*., *Sex Transm Infect*. 2010 Nov;86(6):465-9.
10. Rockett R, Goire N, Linnios A, Turra M, Higgins G, Lambert SB, Bletchly C, Nissen MD, Sloots TP, Whiley DM., Evaluation of the cobas 4800 CT/NG test for detecting *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*., *Sex Transm Infect*. 2010 Nov;86(6):470-3.
11. Gaydos CA, Cartwright CP, Colaninno P, Welsch J, Holden J, Ho SY, Webb EM, Anderson C, Bertuzis R, Zhang L, Miller T, Leckie G, Abravaya K, Robinson J., Performance of the Abbott RealTime CT/NG for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*., *J Clin Microbiol*. 2010 Sep;48(9):3236-43.
12. Hopkins MJ, Ashton LJ, Alloba F, Alawatagama A, Hart IJ., Validation of a laboratory-developed real-time PCR protocol for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in urine., *Sex Transm Infect*. 2010 Jun;86(3):207-11.
13. Soni S, Alexander S, Verlander N, Saunders P, Richardson D, Fisher M, Ison C., The prevalence of urethral and rectal Mycoplasma genitalium and its associations in men who have sex with men attending a genitourinary medicine clinic., *Sex Transm Infect*. 2010 Feb;86(1):21-4.
14. Shipitsyna E, Zolotoverkhaya E, Hjelmevoll SO, Maximova A, Savicheva A, Sokolovsky E, Skogen V, Domeika M, Unemo M., Evaluation of six nucleic acid amplification tests used for diagnosis of Neisseria gonorrhoeae in Russia compared with an international strictly validated real-time porA pseudogene polymerase chain reaction., *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009 Nov;23(11):1246-53.
15. Unemo M, Olcén P, Fredlund H, Thulin S., Real-time PCR and subsequent pyrosequencing for screening of penA mosaic alleles and prediction of reduced susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins in Neisseria gonorrhoeae., *APMIS*. 2008 Nov;116(11):1004-8.
16. Vernel-Pauillac F, Hogan TR, Tapsall JW, Goarant C., Quinolone resistance in Neisseria gonorrhoeae: rapid genotyping of quinolone resistance-determining regions in gyrA and parC genes by melting curve analysis predicts susceptibility., *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Mar;53(3):1264-7.
17. Kimmitt PT, Kirby A, Perera N, Nicholson KG, Schober PC, Rajakumar K, Chapman CA., Identification of Neisseria gonorrhoeae as the causative agent in a case of culture-negative dermatitis-arthritis syndrome using real-time PCR., *J Travel Med*. 2008 Sep-Oct;15(5):369-71.

18. Reyes PA, Vargas MF, García KP, Rubilar PS, Navarrete PA, Fuentes PM, Ríos MA, Orihuela PA, Vargas RH, Rubio VH, Heckels J, Christodoulides M, Cárdenas H, Velasquez LA., Apoptosis related genes expressed in cultured Fallopian tube epithelial cells infected in vitro with *Neisseria gonorrhoeae*., *Biol Res*. 2007;40(3):319-27. Epub 2008 Apr 17.
19. Hjelmevoll SO, Olsen ME, Sollid JU, Haaheim H, Melby KK, Moi H, Unemo M, Skogen V., Clinical validation of a real-time polymerase chain reaction detection of *Neisseria gonorrhoeae* porA pseudogene versus culture techniques., *Sex Transm Dis*. 2008 May;35(5):517-20.
20. Schabereiter-Gurtner C, Hufnagl P, Sonvilla G, Selitsch B, Rotter ML, Makrithatis A, Hirschl AM., Evaluation of a novel internally controlled real-time PCR assay targeting the 16S rRNA gene for confirmation of *Neisseria gonorrhoeae* infections., *Clin Microbiol Infect*. 2008 May;14(5):480-6.
21. Chui L, Chiu T, Kakulphimp J, Tyrrell GJ., A comparison of three real-time PCR assays for the confirmation of *Neisseria gonorrhoeae* following detection of *N. gonorrhoeae* using Roche COBAS AMPLICOR., *Clin Microbiol Infect*. 2008 May;14(5):473-9.
22. Goire N, Nissen MD, LeCornec GM, Sloots TP, Whiley DM., A duplex *Neisseria gonorrhoeae* real-time polymerase chain reaction assay targeting the gonococcal porA pseudogene and multicopy opa genes., *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008 May;61(1):6-12.
23. Mangold KA, Regner M, Tajuddin M, Tajuddin AM, Jennings L, Du H, Kaul KL., *Neisseria* species identification assay for the confirmation of *Neisseria gonorrhoeae*-positive results of the COBAS Amplicor PCR., *J Clin Microbiol*. 2007 May;45(5):1403-9.
24. Marshall R, Chernesky M, Jang D, Hook EW, Cartwright CP, Howell-Adams B, Ho S, Welk J, Lai-Zhang J, Brashear J, Diedrich B, Otis K, Webb E, Robinson J, Yu H., Characteristics of the m2000 automated sample preparation and multiplex real-time PCR system for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*., *J Clin Microbiol*. 2007 Mar;45(3):747-51.
25. Hjelmevoll SO, Olsen ME, Sollid JU, Haaheim H, Unemo M, Skogen V., A fast real-time polymerase chain reaction method for sensitive and specific detection of the *Neisseria gonorrhoeae* porA pseudogene., *J Mol Diagn*. 2006 Nov;8(5):574-81.
26. Vernel-Pauillac F, Falcot V, Whiley D, Merien F., Rapid detection of a chromosomally mediated penicillin resistance-associated ponA mutation in *Neisseria gonorrhoeae* using a real-time PCR assay., *FEMS Microbiol Lett*. 2006 Feb;255(1):66-74.
27. Geraats-Peters CW, Brouwers M, Schneeberger PM, van der Zanden AG, Bruisten SM, Weers-Pothoff G, Boel CH, van den Brule AJ, Harmsen HG, Hermans MH., Specific and sensitive detection of *Neisseria gonorrhoeae* in clinical specimens by real-time PCR., *J Clin Microbiol*. 2005 Nov;43(11):5653-9.
28. Whiley DM, Sloots TP., Comparison of three in-house multiplex PCR assays for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* using real-time and conventional detection methodologies., *Pathology*. 2005 Oct;37(5):364-70.
29. Caliendo AM, Jordan JA, Green AM, Ingersoll J, Diclemente RJ, Wingood GM., Real-time PCR improves detection of *Trichomonas vaginalis* infection compared with culture using self-collected vaginal swabs., *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2005 Sep;13(3):145-50.

30. Whiley DM, Buda PP, Freeman K, Pattle NI, Bates J, Sloots TP., A real-time PCR assay for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* in genital and extragenital specimens., *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005 May;52(1):1-5.
31. Jordens JZ, Heckels JE., A novel porA-based real-time PCR for detection of meningococcal carriage., *J Med Microbiol*. 2005 May;54(Pt 5):463-6.
32. Koenig MG, Kosha SL, Doty BL, Heath DG., Direct comparison of the BD ProbeTec ET system with in-house LightCycler PCR assays for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* from clinical specimens., *J Clin Microbiol*. 2004 Dec;42(12):5751-6.

33. Whiley DM, Buda PJ, Bayliss J, Cover L, Bates J, Sloots TP., A new confirmatory *Neisseria gonorrhoeae* real-time PCR assay targeting the *porA* pseudogene., *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004 Sep;23(9):705-10.
34. Tabrizi SN, Chen S, Cohenford MA, Lentricchia BB, Coffman E, Shultz T, Tapsall JW, Garland SM., Evaluation of real time polymerase chain reaction assays for confirmation of *Neisseria gonorrhoeae* in clinical samples tested positive in the Roche Cobas Amplicor assay., *Sex Transm Infect*. 2004 Feb;80(1):68-71.
35. Simms I, Eastick K, Mallinson H, Thomas K, Gokhale R, Hay P, Herring A, Rogers PA., Associations between *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis* and pelvic inflammatory disease., *J Clin Pathol*. 2003 Aug;56(8):616-8.
36. Binnicker MJ, Williams RD, Apicella MA., Infection of human urethral epithelium with *Neisseria gonorrhoeae* elicits an upregulation of host anti-apoptotic factors and protects cells from staurosporine-induced apoptosis., *Cell Microbiol*. 2003 Aug;5(8):549-60.
37. Whiley DM, LeCornec GM, Mackay IM, Siebert DJ, Sloots TP., A real-time PCR assay for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* by LightCycler., *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002 Feb;42(2):85-9.

