

بررسی فراوانی سکانس باکتریال در بیماران کاوازاکی بستری در مرکز طبی کودکان به روش Universal PCR طی سال های ۸۶-۸۵

محمدصادق رضائی (M.D.)⁺ سید احمد سیادت (M.D.)^{**} قمر تاج خطائی (M.D.)^{***} ستاره میبشی (M.D.)^{***}
فرح صابونی (M.D.)^{****} بابک پوراکبری (M.Sc.)^{*****} امید پزند (M.Sc.)^{*****}

چکیده

سابقه و هدف: کاوازاکی بیماری مهم و خطرناک با عوارض وخیم اما قابل پیشگیری می باشد، به شرطی که زود تشخیص داده شود و درمان گردد. علی رغم سال ها تلاش و تحقیق، هنوز عوامل ایجاد بیماری کاوازاکی ناشناخته باقی مانده است.

مواد و روش ها: کلیه بیماران مبتلا به سندرم کاوازاکی که در مرحله حاد در سال های ۱۳۸۶-۱۳۸۵ به مرکز طبی کودکان مراجعه نمودند و قبلاً IVIG (گاما گلوبولین وریدی) نگرفتند در مطالعه قرار گرفتند سپس فرم پرسشنامه تکمیل گردید و ۳-۵ سی سی خون کامل درلوله حاوی EDTA از بیمار گرفته شد و پس از سانتریفوژ در منفی هفتاد درجه نگهداری شد. تعداد نمونه ها ۴۳ عدد بوده است که پس از اتمام دوره تحقیق جهت UPCR مورد استفاده قرار گرفت.

یافته ها: از ۴۳ بیمار مورد بررسی ۲۸ نفر مذکر و ۱۵ نفر مونث بودند. بیماران از ۶ ماهه تا ۹ ساله بودند. ۲۹ مورد کاوازاکی با علائم داشتند و ۱۴ مورد کاوازاکی بدون علامت داشتند. در ۲ بیمار یک پسر و یک دختر از ۴۳ بیمار مورد مطالعه با روش UPCR ترتیب ژنی باکتری ژن 16S rRNA یافت شد. کشت خون در همه بیماران منفی بود. لنفادنوپاتی در ۱۷ مورد، راش در ۳۶ مورد، ۵ مورد اریتم اطراف محل تلقیح ب-ت-ژ، تغییر در اندام ها به صورت ادم و قرمزی کف دست و پا در ۱۶ مورد، پوسته ریزی در اندام های انتهایی در ۲۸ مورد تغییرات قلبی در ۸ مورد و ترومبوسیتوز در ۳۶ بیمار وجود داشت، رسوب سرم بین ۳۰ تا ۱۲۵ بوده است.

استنتاج: در مطالعه ما فقط دو بیمار مبتلا به کاوازاکی حاد که قبلاً IVIG نگرفته بودند دارای ترتیب ژنی باکتریال 16S rDNA در لکوسیت های خود بودند. همانند مطالعات مشابه می توان علت باکتریال را در به وجود آوردن ویا تریگر کردن بیمار مستعد به کاوازاکی، دخیل دانست. در این مطالعه ارتباطی بین علامت دار یا بدون علامت بودن کاوازاکی، جنسیت، فصل، سن، بیماری کرونری ویا سایر علائم و نشانه ها و وجود ترتیب ژنی باکتری یافت نشد.

واژه های کلیدی: کاوازاکی، Universal PCR، ترتیب ژنی باکتریایی

⁺مؤلف مسئول: دکتر محمد صادق رضائی- تهران، انتهای بلوار کشاورز، خیابان قریب، بیمارستان مرکز طبی کودکان، بخش عفونی، مرکز تحقیقات عفونی
E-mail: Drmsrezaii@yahoo.com

^{**} فوق تخصص عفونی اطفال، استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران

^{*} دستیار فوق تخصص عفونی اطفال، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^{***} فوق تخصص عفونی اطفال

^{****} فوق تخصص عفونی اطفال، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران

^{*****} کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^{*****} دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ تصویب: ۸۷/۳/۲۲

تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۷/۳/۷

تاریخ دریافت: ۸۷/۲/۳۰

مقدمه

کاوازاکی بیماری مهم و خطرناک با عوارض وخیم اما قابل پیشگیری می باشد. به شرطی که زود تشخیص داده شود و درمان گردد. علی رغم سال ها تلاش و تحقیق، هنوز عوامل اتیولوژیک بیماری کاوازاکی ناشناخته باقی مانده است. محققین به دلایل زیر عوامل عفونی را در عامل آن دخیل دانستند: تب، اگزانت، کتکویت، آدنوپاتی، مشاهده بیماری در زمستان و بهار و همچنین خود محدود شونده بودن بیماری (۳ تا ۱)، از طرفی نادر بودن بیماری در شیرخواران کمتر از سه ماه، نشانه انتقال آنتی بادی از مادر به شیرخوار می باشد و همچنین فرم های بالینی کاوازاکی با الگوهای از عفونت ریکتزیا و باکتریال همراهی دارد مثل سندرم شوک توکسیک، تب روماتیسمی حاد، تب یونجه، سندرم پوست متفلس استافیلوکوکی، تب کوه های راکی و لپتوسپیروز. اما تا به حال ارتباط ثابت شده اتیولوژیک با این عوامل در پرده ای از ابهام می باشد (۶ تا ۳) با این که کشت خون، روش رایجی برای شناسایی باکتری ها می باشد اما در مواردی که باکتری های دیر رشد یا میکروب های غیر قابل کشت مثل بارتوبلا هنسله و ارلیشیا وجود دارند و همچنین بیمارانی که قبل از مراجعه آنتی بیوتیک مصرف کردند کشت خون روش مناسبی برای شناسایی باکتری ها نیست. PCR روش جدیدی است که به وسیله آن می توان وجود یک ترتیب ژنی DNA یا RNA را در یک نمونه حاوی ۱۰^۵ سلول پیدا کرد. اکنون PCR اختصاصی برای فهرست رو به رشدی از میکروب در دسترس است. این روش ها از حساسیت بسیار بالایی نسبت به روش های سنتی رایج برخوردارند و در زمانی حدود ۴ تا ۹ ساعت با مقادیر اندک ارگانسم در نمونه میکروب را شناسایی می کنند. از آنجایی که تکثیر به وسیله PCR به قابلیت حیات یا

رشد باکتری وابسته نیست، این تکنیک برای شناسایی باکتری در خون حتی در حضور مهار کننده های رشد باکتری از جمله آنتی بیوتیک ها سودمند است. از طرفی با توجه به متهم بودن باکتری ها در اتیولوژی کاوازاکی باید روشی را برای مطالعه انتخاب کرد که بتواند وجود تمام باکتری ها را در لکوسیت هایی که آنها را بلعیدند و مدت ها ممکن است با خود به همراه داشته باشند، شناسایی کند. در سال های اخیر روش جالب UPCR^۱ بر اساس دسته بندی فیلوژنیک باکتری ها که بر پایه ترتیب ژنی (rDNA) می باشد، بنا نهاده شد. در این روش از پرایمرهایی استفاده می کنند که تعداد ۹۹۷ جفت باز از ژن 16S rRNA را آمپلیفیه می کند که تقریباً همه باکتری ها آن سکانس ژن (rRNA) را دارند و آن، ژن های 16S rDNA می باشد که با تکثیر مستقیم ژن های باکتریال نمونه های بالینی وجود این ترتیب های ژنی مشترک در انواع گوناگون باکتری ها نشان داده می شود (۷ تا ۹). در سال ۱۹۹۹ شیباتا و همکاران برای اولین بار از روش UPCR برای شناسایی اتیولوژی باکتریال در سندرم کاوازاکی استفاده کردند و در بررسی ۲۰ بیمار مبتلا به کاوازاکی با روش PCR از لئوسیت های خون محیطی این سکانس را در سه بیمار یافتند (۷). اما این که بتوان گفت که باکتری ها در علت باکتریایی کاوازاکی سهم هستند، نیاز به مطالعه بیشتر دارد. با توجه به آنچه بیان شد و به خاطر نیاز به تحقیق بیشتر برای یافتن عوامل اتیولوژیک این بیماری و از طرفی با توجه به موارد فراوان مراجعه این بیماران به بیمارستان مرکز طبی بر آن شدیم تا از روش UPCR ترتیب ژنی باکتری ها را در لکوسیت های خون محیطی این بیماران سنجش نماییم. از این دست مطالعه در بیماران کاوازاکی تا به حال به صورت گسترده در دنیا

1. Universal Polymerase Chain Reaction

انجام نشد. در کشور ایران نیز با آخرین اطلاعات ما چنین مطالعه ای صورت نگرفته است و از این لحاظ منحصر به فرد است.

مواد و روش ها

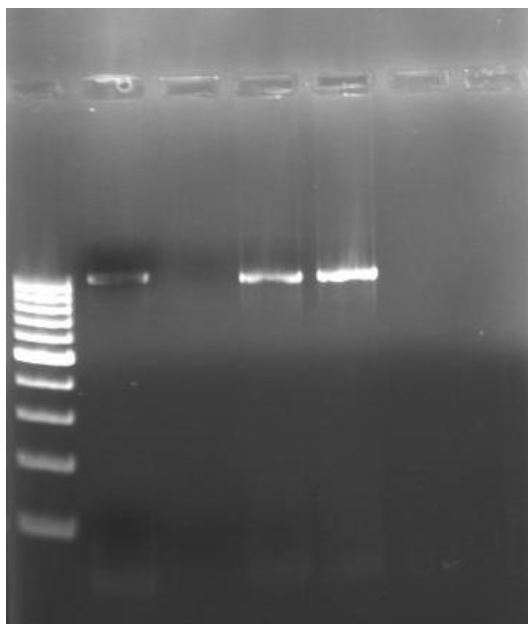
کلیه بیماران مبتلا به سندرم کاوازاکی که در مرحله حاد در سال‌های ۱۳۸۶-۱۳۸۵ به مرکز طبی کودکان مراجعه نمودند و قبلاً IVIG^۱ نگرفتند پس از موافقت خانواده‌ها در مطالعه قرار گرفتند. این بیماران توسط دستیار فوق تخصصی عفونی و فوق تخصص عفونی معاینه شدند و تشخیص کاوازاکی مسجل گردید. کاوازاکی تیپیک به بیمارانی اطلاق شد که تب به مدت حداقل پنج روز به‌مراه وجود حداقل ۴ نشانه از ۵ نشانه زیر: قرمزی دو طرفه ملتحمه بولبر (عموماً غیر چرکی)، تغییرات مخاط اورفارنکس شامل قرمزی حلق، لب‌های قرمز و ترک خورده و زبان توت فرنگی، تغییرات اندام محیطی از قبیل ادم و یا اریتم دست‌ها و پاها در مرحله حاد یا پوسته‌ریزی در مرحله تحت حاد، راش طور اولیه بر روی تنه، (پلی مورف ولی غیر وزیکولر)، آدنوپاتی گردنی بیش از ۱/۵ سانتی‌متر معمولاً لنفادنوپاتی یک طرفه را داشتند. کاوازاکی بدون علامت به بیمارانی اطلاق شد که تب کمتر از ۵ روز و حداقل دو علامت کلاسیک فوق را دارا بودند. سپس فرم پرسشنامه که حاوی متغیرهای مطالعه بود پر گردید و ۳-۵ سی سی خون کامل در لوله حاوی EDTA^۲ از بیمار گرفته شد و پس از سانتریفوژ در منفی هفتاد درجه نگهداری شد. تعداد نمونه‌ها ۴۳ عدد بوده است که پس از اتمام دوره تحقیق جهت UPCR مورد استفاده قرار گرفت. روش انجام کار به صورت زیر بوده است: ابتدا گلبول سفید از نمونه‌ها استخراج گردید، سپس گلبول‌های سفید لیز و استخراج DNA از لکوسیت‌ها

انجام شد. به دلیل این که مایع حاوی DNA دارای مواد شیمیایی و یون‌های موجود در محلول لیزکننده می‌باشد، DNA با روش فنل-کلروفرم ایزوآمیل الکل DNA تخلیص گردید. در این روش، فنل به صورت اشباع شده (equilibrate) استفاده گردید. میزان DNA استخراج شده از نمونه‌های PBLs جمع‌آوری شده، توسط دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ nm خوانده شد. به طور میانگین مقدار DNA ۰/۷ μg/μl از تعداد $10^5 - 2 \times 10^6$ PBLs جدا گردید. درجه خلوص DNA حاصل (۲۶۰/۲۸nm) برابر ۱/۷۰ به دست آمد. از پرایمرهای 5'-CCAGCAGCCGCGTAATACG-3' U1 و 5'-ATCGG(C/T)TACCTTGTTACGATTC-3' U2 برای شناسایی کلیه باکتری‌ها استفاده شد. این پرایمرها تعداد ۹۹۷ جفت باز از ژن 16S rRNA را آمپلیفیه می‌کند. پس از استخراج DNA از سوش‌های استاندارد UPCR با شرایط زیر انجام گرفت. با آب مقطر حجم واکنش به ۵۰ میکرو لیتر افزایش یافت. با ترموسیکلر اپندرف واکنش تکثیر به صورت زیر انجام شد: دناتوراسیون در ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، آنیلینگ در ۵۵ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و اکستنسین در ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه انجام گرفت. این مراحل ۳۰ بار تکرار شد. قبل از این مراحل پره دناتوراسیون به مدت ۵ دقیقه و بعد از مراحل فوق نیز Post extension به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید نوارهای DNA توسط دستگاه UV Transilluminator قابل مشاهده شدند و از آنها عکس گرفته شد. ستون‌های M شاخص وزنی DNA (100bp)، ستون ۱ محصول PCR سویه استاندارد، ستون ۲ محصول PCR و ستون ۳ محصول. پس از راه‌اندازی UPCR آزمایش، بر روی ۴۳ نمونه، DNA

1. Intravenous Immune Globulin (Immunoglobulin)
2. Eithlenediaminetetraacetic Acid

جدول شماره ۲: مقایسه علائم بالینی غیر اصلی و پاراکلینیکی سندرم کاوازاکی در کل بیماران و بیماران PCR+

علائم بالینی و پاراکلینیکی	کل بیماران (۴۳ بیمار)	PCR+ (۲ بیمار)
آنورسم کرونر	۶ (۱۳/۹۵٪)	۰ (۰٪)
هیدروپس کیسه صفرا	۸ (۱۸/۶۰٪)	۰ (۰٪)
سدیمان بالای ۳۰	۴۳ (۱۰۰٪)	۲ (۴/۶۵٪)
کامل ادرار فعال	۱۳ (۳۰/۲۳٪)	۱ (۲/۳۲٪)
پلاکت < ۴۰۰۰۰	۴۲ (۹۷/۶۷٪)	۲ (۴/۶۵٪)
لکوسیت < ۱۵۰۰۰	۲۱ (۴۸/۸۳٪)	۰ (۰٪)
هموگلوبین > ۱۰	۲۲ (۵۱/۱۶٪)	۲ (۴/۶۵٪)
پوسته ریزی اندامها	۲۸ (۶۵/۱۱٪)	۲ (۴/۶۵٪)
ارتم اطراف محل BCG	۵ (۱۱/۶۲٪)	۰ (۰٪)
مصرف آنتی بیوتیک قبل از مراجعه	۱۶ (۳۷/۲۰٪)	۱ (۲/۳۲٪)
کشت خون مثبت	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)
اوتیت	۴ (۹/۳۰٪)	۱ (۲/۳۲٪)
آرتریت	۳ (۶/۹۷٪)	۱ (۲/۳۲٪)
سندرم تبیک کاوازاکی	۲۹ (۶۷/۴۴٪)	۲ (۴/۶۵٪)



شکل شماره ۱: باندهای سکانس باکتریال با روش UPCR در دو بیمار با سندرم کاوازاکی

دو بیمار وضع اجتماعی اقتصادی بالا داشتند. ۵ بیمار از نظر اقتصادی پایین بودند. ۳۵ بیمار از وضع اجتماعی و اقتصادی متوسط برخوردار بودند. ۲۰ بیمار در زمستان، ۱۳ مورد در بهار، ۶ بیمار در پائیز و ۴ مورد در تابستان مراجعه نمودند.

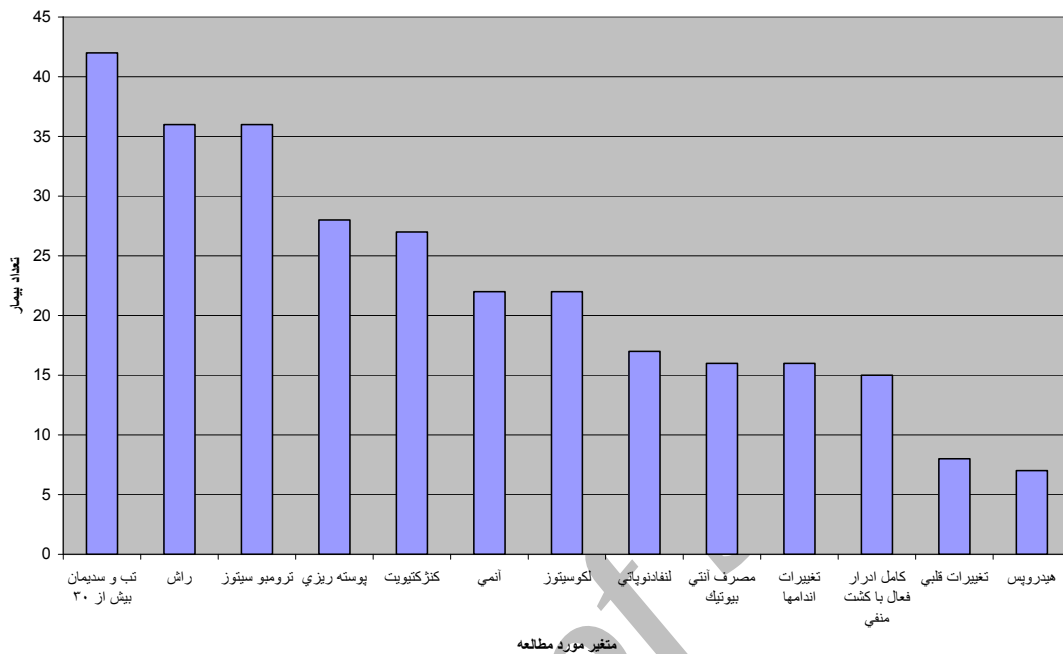
استخراج شده از لکوسیت خون‌های جمع آوری شده از بیماران شروع گردید. همزمان از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی و از DNA استخراج شده به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. محصول حاصل از آزمایش PCR بر روی ژل آگارز برده شد و در صورت مشاهده باند مورد نظر با توجه به حرکت الکتروفورتیک و وزن آن در کنار شاخص وزنی DNA نمونه از نظر باکتری‌های فوق مثبت در نظر گرفته شد. کنترل منفی و مثبت همراه نمونه‌های بیماران همواره باید به ترتیب منفی و مثبت می‌شدند در غیر این صورت آزمایش‌ها تکرار می‌گردید. سایر اطلاعات از پرسشنامه استخراج گردید و متغیرهای مورد نظر جمع‌آوری و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها

در کل از ۴۳ بیمار مورد بررسی نتایج زیر بر اساس پرسشنامه به دست آمد (نمودار شماره ۱): ۲۸ نفر مذکر و ۱۵ نفر مونث بودند. بیماران از ۶ ماهه تا ۹ ساله بودند. ۳۳ بیمار بین یک تا ۳/۵ سال بودند. ۲۹ مورد کاوازاکی تبیک با علائم کامل داشتند و ۱۴ مورد کاوازاکی بدون علامت داشتند. در ۲ بیمار (۴/۵۶ درصد) از ۴۳ بیمار مورد مطالعه با روش UPCR سکانس باکتریال ژن 16S rRNA یافت شد (شکل شماره ۱). مقایسه علائم بالینی و پاراکلینیکی در کل بیماران و بیماران PCR+ در (جداول شماره ۱ و ۲) و (نمودار شماره ۱) آورده شده است.

جدول شماره ۱: مقایسه علائم بالینی اصلی سندرم کاوازاکی در کل بیماران و بیماران PCR+

علائم بالینی	کل بیماران (۴۳ بیمار)	PCR+ (۲ مورد)
تب	۴۳ (۱۰۰٪)	۲ (۴/۶۵٪)
کنژکتیویت	۲۷ (۶۲/۷٪)	۲ (۴/۶۵٪)
ضایعات دهانی	۳۳ (۷۶/۷۴٪)	۲ (۴/۶۵٪)
راش	۳۶ (۸۳/۷۲٪)	۲ (۴/۶۵٪)
لنفادنوپاتی	۱۷ (۳۹/۵۳٪)	۱ (۲/۳۲٪)
تغییرات اندام محیطی	۱۶ (۳۷/۲۰٪)	۱ (۲/۳۲٪)



نمودار شماره ۱: فراوانی علائم و نشانه ها در جمعیت مورد مطالعه

می باشد، بنا نهاده شد. در این روش از پرایمرهایی استفاده می کنند که تعداد ۹۹۷ جفت باز از ژن 16S rRNA را آمپلیفیه می کند که تقریباً همه باکتری ها آن سکانس ژن (rRNA) را دارند و آن ژن های 16S rDNA می باشد که با آمپلیفیکاسیون مستقیم ژن های باکتریال نمونه های بالینی وجود این سکانس های مشترک در انواع گوناگون باکتری ها نشان داده می شود (۹ تا ۷). در سال ۱۹۹۹ شیپاتا و همکاران برای اولین بار از روش UPCR برای شناسایی علت باکتریال در سندرم کاوازاکی استفاده کردند و در بررسی ۲۰ بیمار مبتلا به کاوازاکی با روش PCR از لنفوسیت های خون محیطی این سکانس را در سه بیمار یافتند (۷). در مطالعه ما بر پایه این حقیقت که باکتری هایی که به عنوان علت سندرم کاوازاکی مطرح هستند را بدون توجه به مصرف آنتی بیوتیک قبلی و یا کند رشد بودن باکتری ظرف ۴ تا ۹ ساعت در لکوسیت های خون

ترومبوسیتوز در ۳۶ بیمار وجود داشت که بین ۱۳۱۹۰۰۰ و ۱۸۱۰۰۰ بود. متوسط میزان پلاکت ۵۲۷۰۰۰ بود. سدیمن سرم بین ۳۰ تا ۱۲۵ بوده است. ۲۰ مورد ۱۰۰ و بالای صد بوده است. متوسط آن ۸۴/۵ بود.

بحث

پزشکان مختلف در سراسر دنیا با مطالعات مختلف عوامل باکتریال استرپتوکوک، استافیلوکوک اورئوس و پروپیونی باکتریوم و کلامیدیا را در علت کاوازاکی دخیل دانستند. اما همه آنها لازم دانستند برای تأیید شدن نیاز به مطالعه بیشتر دارد (۹، ۷، ۴). در سال ۱۹۹۳ لنونگ و همکارانش از بیماران کاوازاکی که همزمان سندرم شوک توکسیک داشتند، توکسین نوع ۱ را جدا کردند (۱۰). در سال های اخیر روش جالب UPCR بر اساس دسته بندی فیلوژنیک باکتری ها که بر پایه ترتیب های ژنی (rDNA)

هر دو مورد PCR مثبت سندرم تیبیک داشتند. هیدروپس کیسه صفرا و آنوريسم کروئیر در موارد مثبت مطالعه دیده نشد. اوئیت در ۴ مورد دیده شد که یک مورد آن PCR مثبت بود. آرتریت در ۳ مورد دیده شد که یک مورد آن PCR مثبت بود.

به طور کلی می توان این طور نتیجه گیری نمود که با توجه به مثبت شدن دو نمونه از ۴۳ بیمار مورد مطالعه همانند مطالعات مشابه هنوز نمی توان به طور قطع باکتری ها را به عنوان علت بیماری کنار گذاشت. توصیه ما این است که روش UPCR به خاطر هزینه نسبتاً گران و این که در برابر آلودگی میکروبی کاملاً آسیب پذیر است به عنوان روش تشخیصی رایج برای شناسایی علت باکتریال در بیماران کاوازاکی استفاده نگردد. ارتباط معنی داری بین باعلامت و بدون علامت بودن کاوازاکی، جنسیت، فصل، سن، بیماری کروئیری و یا سایر علائم و نشانه ها و وجود سکانس باکتریال یافت نشد. در واقع این سوال همچنان مطرح است که شیوع حقیقی سکانس 16S rDNA در ترتیب ژنی باکتری چه میزان است؟ البته لازم است در این زمینه محققین با تعداد موارد بیشتر و در مراکز بیمارستانی متعدد مطالعات بیشتری نمایند.

سپاسگزاری

از دانشگاه علوم پزشکی تهران بخاطر تامین هزینه طرح، و خانم حسینی به خاطر گرفتن نمونه از بیماران و خانواده آنها که با انجام این آزمایش موافقت نمودند صمیمانه سپاسگزاریم.

References

1. Kawasaki T, Kosaki F, Okawa S, et al. A new infantile acute febrile mucocutaneous lymph node syndrome prevailing in Japan. *Pediatrics* 1974; 54: 271-281.
2. Burns JC, Kushner HI, Bastian JF, Shike H, Shimizu C, Matsubara T, et al. Kawasaki disease: a brief history. *Pediatrics* 2000; 106: E27.

محیطی، با این روش می توان یافت، سکانس 16S rDNA را در بیماران مورد مطالعه مورد بررسی قرار دادیم. در مطالعه ما در مرحله حاد کاوازاکی از ۴۳ بیمای که IVIG نگرفته بودند و به بیمارستان مرکز طبی کودکان تهران مراجعه نموده بودند فقط دو بیمار دارای سکانس باکتریال 16S rDNA در لکوسیت های خود بودند. که با نمونه مثبت و منفی هنگام انجام آزمایش موارد مثبت و منفی کاذب مطالعه حذف شد و این در حالی بود که کشت خون تمام بیماران منفی بود. البته لازم است در مطالعات دیگر سکانس اختصاصی باکتریال با روش Nested PCR یا Real Time PCR نوع میکروب هم شناسایی گردد. با توجه به اینکه فقط در دو نمونه سکانس ژنی 16S rDNA شناسایی شد در حال حاضر نمی توان آن را با اطمینان در اتیولوژی کاوازاکی دخیل دانست هر چند نمی توان آن را هم کنار گذاشت و توصیه به مطالعات بیشتر می کنیم تا بتوان راجع به این موضوع قضاوت کرد. در حال حاضر توصیه ما این است که روش UPCR بخاطر هزینه نسبتاً گران و این که در برابر آلودگی میکروبی کاملاً آسیب پذیر است به عنوان روش تشخیصی رایج برای شناسایی علت باکتریال در بیماران کاوازاکی استفاده نگردد. ۱۶ بیمار قبل از مراجعه مصرف آنتی بیوتیک داشتند که یک مورد از آنها PCR مثبت بود. تب، راش، ضایعات دهانی و کنژکتیویت در هر دو بیمار PCR مثبت وجود داشت ولی تغییرات اندام ها و لنفادنوباتی فقط در یکی از این دو بیمار وجود داشت. در این مطالعه ۲۹ بیمار سندرم تیبیک داشتند که

3. David Burgner, Anthony Harnden. Kawasaki disease: What is the epidemiology telling us about the etiology?. *Int J Infect Dis* 2005; 9: 185-194.
4. Newburger JW, Fulton DR. Kawasaki disease. *Curr Opin Pediatr* 2004; 16: 508-514.
5. Chih-Lu W, Yu-Tsun W, Chieh-An L, Ho-Chang K, Kuender D. Kawasaki Disease Infection, Immunity and Genetics. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24(11): 998-1004.
6. Zucol F, Ammann R, Berger, Aebi C, Altwegg M, Niggli F, Nadal D. Real-Time quantitative Broad-Range PCR Assay for Detection of the 16S rRNA Gene Followed by Sequencing for Species Identification. *J Clin Microbiol* 2006; 44(8): 2750-2759.
7. Motohiro S, Takayuki E, Mitsuhiro H, et al. Isolation of Kawasaki disease-associated bacterial sequence from peripheral blood leukocytes. *Pediatr Int* 1999; 41: 467-472.
8. Relman DA, Falkow S. A molecular perspective of microbial pathogenesis. In: Mandell GL, Bennet JE, editors. *Principles and practice of infectious diseases*. 5th ed. Philadelphia: Churchill living stone, 2000. P: 10.
9. Melish ME, Marchette MJ, Kaplan JC, Kihara S, Ching D, Ho DD. Absence of significant RNA-dependent DNA polymerase activity in lymphocytes from patients with Kawasaki syndrome. *Nature* 1989; 337: 288-290.
10. Rowley AH, Wolinsky SM, Relman DA et al. Search for highly conserved viral and bacterial nucleic acid sequences corresponding to an etiologic agent of Kawasaki disease. *Pediatr Res* 1994; 36: 567-571.