مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شهید صدوقی یزد
دوره سیزدهم، شماره پنجم، زمستان۱۳۸٤، صفحات ١٤-٩

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 2:58 IRDT on Saturday May 15th 2021

بررسی سطح اندوتوکسین خون بیماران همودیالیزی و مقایسه آن با کشت خون

دکتر حاجیه قاسمیان صفایی[1]، دکتر رحمت الله یزدانی[2]، دکتر فرح تاج نواب اکبر[3]،* ژینا وزیر زاده[4]

چکیده

مقدمه: یکی از علل مرگ و میر در بیماران همودیالیزی باکتریمی بوده که حدود نیمی از موارد آن ناشی از باکتریهای گرم منفی می باشد. آزاد شدن اندوتوکسین ناشی از لیز این باکتریها در خون منجر به ایجاد پاسخهای التهابی و دفاعی شدید در بدن شده و در صورت عدم درمان سریع و مؤثر منتهی به شوک عفونی و در نهایت مرگ بیمار می گردد. هدف از این مطالعه، اندازه گیری سطح اندوتوکسین خون در بیماران مبتلا به باکتریمی ناشی از باکتریهای گرم منفی به روش(Limulus Amebocyte (LAL-test lysate test می باشد و با توجه به اینکه این روش در مقایسه با کشت خون نیاز به مدت زمان بسیار کوتاهتری دارد، کاربرد آن در شناسایی سریع مبتلایان و تشخیص اندوتوکسمی مورد توجه قرار گرفته است .

روش بررسی: مطالعه در سه مرحله اجرا گردید : در مرحله اول ۲۷۸ نمونه کشت خون از بیماران همودیالیزی جمع آوری و باکتریهای بیماری زا از کشت های خون مثبت ایزوله و شناسایی گردیدند . در مرحله دوم حساسیت باکتریها به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه بررسی گردید . در مرحله سوم سطح اندوکسین خون بیماران مبتلا به باکتریمی ناشی از باکتریهای گرم منفی با آزمایش لیمولوس اندازه گیری شد. کیت مورد استفاده در این روش E-toxate محصول شرکت زیگما می باشد .

نتایج: در این مطالعه، شیوع باکتریمی در بیماران همودیالیزی ۱۳/۶٪ به دست آمد . شیوع باکتریمی ناشی از باکتریهای گرم منفی در کشت های مثبت ۴۴/۷ ٪ گزارش شد و پاتوژن غالب اشرشیاکلی بود . همچنین بیشترین ایزوله کلینیکی در باکتریهای گرم مثبت استافیلوکوک اورئوس بود . میانگین سطح اندوتوکسین خون بیماران $^{Eu}/_{ml}$ ۱/۰۸ ± ۳/۸ به دست آمد و حساسیت روش به کار رفته (Gel – Clot) ۸۸٪ و ویژگی آن ۹۵٪ محاسبه گردید .

مقایسه نتایج حاصل از کشت خون بیماران و LAL – test در باکتریهای گرم منفی تفاوت آماری معنی داری را نشان نداد.

نتیجه گیری: روش LAL-test در زمانی کمتر از دو ساعت جواب داده و نتایج به سرعت توسط پزشک قابل دسترس می باشد و می تواند به عنوان یک روش سریع و قابل اعتماد در شناسایی بیماران مبتلا به باکتریمی ناشی از باکتریهای گرم منفی به کار رود ولیکن باید در نظر گرفته شود که این تست بسیار حساس می باشد و در صورتی می توان با اطمینان کامل آن را جایگزین کشت خون نمود که تمام مراحل انجام آزمایش در شرایط کاملاً استریل و عاری از اندوتوکسین انجام پذیرد .

واژه های کلیدی : باکتریمی، اندوتوکسین، همودیالیز، LAL

مقدمه

امروزه دسترسی وسیع به دیالیز موجب افزایش طول عمر هزاران نفر از بیماران مبتلا به نارسایی پیشرفته کلیوی شده است . همودیالیز رایج ترین روش دیالیز است که می تواند از

*٤- نویسنده مسئول – کارشناس ارشد میکروب شناسی، آدرس: سازمان تأمین اجتماعی - اصفهان
همراه:۰۹۱۳۱۱۷۲٦۰۸ ، نمابر: ۰۳۱۱-٦۲٤۳۰۲۸
E mail: Vazirzadeh2006@yahoo.com
۱، ۲ و۳ – استادیار گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان
تاریخ دریافت :۸۳/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش:۸٤/۱۰/۱

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 2:58 IRDT on Saturday May 15th 2021

مرگ بیماران جلوگیری کند، اما نمی تواند به طور کامل جایگزین عملکرد کلیه شود و بیمار در معرض مشکلات و عوارض متعددی قرار دارد [۱].

یکی از علل منجر به مرگ در میان بیماران با همودیالیز مزمن باکتریمی می باشد که عمدتاً به علت وجود ریسک فاکتورهایی مانند: دیالیزهای مستمر و طولانی مدت ، ضعیف بودن سیستم ایمنی ، بیماریهای زمینه ای ، کاتترگذاری و ایجاد فیستول جهت دسترسی به گردش خون بیمار ، آلودگی باکتریایی آب مصرفی و دیالیزات، روشهای ضد عفونی کننده نامناسب و مصرف انواع مختلف داروها که منجر به تغییر فلور طبیعی بدن و ایجاد محیط مناسب جهت تهاجم و کولونیزاسیون طیف وسیعی از باکتریها می گردد، می باشد [۲،۳].

با توجه به مطالعات انجام شده ، حدود نیمی از موارد باکتریمی ناشی از باکتریهای گرم منفی می باشد و شیوع آن ۷۰۰۰۰ تا ۳۳۰۰۰۰ مورد در سال تخمین زده می شود . افزایش شیوع باکتریمی ناشی از باکتریهای گرم منفی در ۲۵ سال اخیر ناشی از فاکتورها و عوامل متعددی مانند افزایش استفاده از روشهای تشخیصی تهاجمی که به علت نفوذ در مناطق استریل بدن مهاجرت و استقرار باکتریها را از بافت محیطی تقویت می کنند، استفاده گسترده از آنتی بیوتیک های وسیع الطیف و دارو درمانی که موجب کاهش فلور نرمال شده و شرایط را برای تهاجم و استقرار باکتریهای گرم منفی مهیا می کنند، جراحیهای دستگاه معدی – روده ای ، مجاری صفراوی و ادراری می باشد .

باکتریمی ناشی از باکتریهای گرم منفی به علت آزاد شدن ماده ای به نام لیپوپلی ساکارید یا اندوتوکسین در خون می باشد . این ماده جزیی از ساختمان دیواره سلولی ارگانیسم است و در خون پاسخهای ایمنی و التهابی شدید در بدن ایجاد می کند که منجر به تولید سیتوکین ها ، فعال سازی واکنش های آبشاری کمپلمان ، فعال سازی آبشار انعقادی و همچنین تحریک تکثیر Bcell می شود . تأثیر مجموعه این عوامل در بدن ایجاد التهاب، انعقاد داخل عروقی ، خونریزی و شوک سپتیک می کند که نهایتاً منجر به مرگ بیمار می شود [۴،۵]. لذا تشخیص سریع و به موقع باکتریمی در بیماران به منظور کاهش مرگ و میر و عوارض ذکر شده حائز اهمیت فراوان می باشد . جهت دستیابی به این هدف ، به نظر می رسد اندازه گیری اندوتوکسین خون در مقایسه با روشهای باکتریولوژیک مرسوم مانند کشت خون ، نیاز به مدت زمان بسیار کوتاهتری داشته و همچنین با توجه به مصرف آنتی بیوتیک در بعضی از بیماران که منجر به منفی شدن کشتهای خون می گردد ، روش LAL-test با تشخیص اندوتوکسین ناشی از متلاشی شدن و لیز باکتریها کمک مؤثری در شناسایی بیماران می نماید [۶].

روش بررسی

این مطالعه توصیفی از مهرماه ۱۳۸۱ تا پایان خرداد ماه ۱۳۸۲ انجام گرفت . جمعیت مورد بررسی بیماران همودیالیزی تحت پوشش مراکز همودیالیز شهرستان اصفهان (بیمارستان شریعتی، حضرت علی اصغر (ع) ، الزهرا و حجتیه) بودند .

حجم نمونه ۲۷۸ نفر بود که به روش نمونه گیری آسان انتخاب گردیدند . نمونه گیری در دو مرحله انجام گرفت. در مرحله اول ۵ سی سی خون جهت کشت خون در محیطهای بی فازیک از بیماران گرفته شد . در مرحله دوم، جهت تعیین سطح اندوتوکسین خون ۴ سی سی خون هپارینه از بیماران گرفته شد و پس از سانتریفوژ و جدا کردن پلاسما در ۲۰- درجه سیلسیوس نگهداری شد . محیط های کشت خون روزانه کنترل شده و با توجه به مشاهدات ماکروسکوپی و ساب کالچر در محیط های EMB ، بلاد آگار وشکلات آگار، باکتریهای بیماری زا به وسیله آزمایشات بیوشیمیایی افتراقی از کشتهای خون مثبت ایزوله و شناسایی گردیدند. همچنین حساسیت باکتریها به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه به وسیله روش کاربی بائر تعیین گردید[۷] جهت تعیین سطح اندوتوکسین خون بیمارانی که مبتلا به باکتریمی ناشی از باسیل های گرم منفی بودند از آزمایش لیمولوس Limulus Amebocyte Lysate (LAL-test) استفاده شد . این روش بر اساس انعقاد یک پروتئین گرفته شده از سلولهای خونی خرچنگ لیمولوس به وسیله اندوتوکسین موجود در نمونه عمل می نماید (Gel-Clot LAL) [۸].

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 2:58 IRDT on Saturday May 15th 2021

جهت تعیین سطح اندوتوکسین به روش نیمه کمی ، کیت تجاری E-toxate ، محصول شرکت زیگما به کار برده شد .

معرفهای موجود E-toxate ,Endotoxin standard . Water endotoxin free بوده که طبق دستورالعمل موجود در کیت آماده شدند. همچنین تهیه رقت های مختلف از استاندارد، روش آزمایش و تفسیر نتایج بر اساس جداول موجود در دستور کار کیت انجام گرفت .

جهت خارج کردن ممانعت کننده های پلاسمایی از تکنیک Dilution-heating (Haris etal) استفاده شد [۸،۹].

سطح اندوتوکسین در نمونه های مثبت بر حسب $^{EU}/_{ml}$ بر اساس فرمول ذکر شده در کیت محاسبه گردید :

عکس بالاترین ضریب رقت نمونه مثبت ضربدر پایین ترین غلظت استاندارد اندوتوکسین که مثبت شده است .

Hard gel = (+)

Absence of gel = (–)

نتایج

نتایج حاصل از انجام آزمایشات باکتریولوژیک در مورد کشت خون بیماران نشان داد که ۳۸ نفر معادل ۱۳/۶٪ مبتلا به باکتریمی ناشی از باسیل های گرم منفی و کوکسیهای گرم مثبت بودند . باسیل های گرم منفی در ۱۷ نفر شناسایی شدند که معادل ۴۵٪ کل نمونه های مثبت از نظر باکتریمی بود و کوکسی های گرم مثبت از ۲۱ نمونه ایزوله گردید (۵۵٪) وجود اندوتوکسین در ۱۵ نمونه خون مبتلایان به باکتریمی ناشی از باسیل های گرم منفی به وسیله LAL-test تشخیص داده شد و به روش تیتراسیون سطح آن در خون اندازه گیری شد و میانگین آن ۱/۰۸ ± ۳/۸۹ (SEM) به دست آمد (جدول ۱) همچنین نتایج حاصل از کشت های خون مثبت و LAL-test در باکتری های گرم منفی با هم مقایسه گردید .(جدول ۲)

با توجه به موارد مثبت و منفی کاذب به دست آمده ، حساسیت آزمایش ۸۸٪ و ویژگی آن ۹۵٪ به دست آمد .

محاسبه :

مثبت حقیقی : a

مثبت کاذب : b

منفی کاذب : c

منفی حقیقی : d

$$\text{حساسیت} = \frac{a}{a+c} = {}^{۱۵}/_{۱۷} = ٪۸۸$$

$$\text{ویژگی} = \frac{d}{b+d} = {}^{۲۰}/_{۲۱} = ٪۹۵$$

نتایج حاصل از مقایسه کشت خون و LAL-test در باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی در (جدول ۳) آورده شده است . در باکتریهای گرم منفی نتایج LAL و کشت خون از نظر آماری اختلاف معنی داری ندارد.

همچنین با تعیین فراوانی نسبی باکتریمی در بیماران همودیالیزی مشخص شد که باکتری غالب در باسیل های گرم منفی اشرشیاکلی (۳۵٪) و در کوکسی های گرم مثبت استافیلوکوک اورئوس (۴۲٪) بود .

جدول ۱ : نتایج حاصل از تعیین سطح اندوتوکسین به تفکیک نوع باکتری بر حسب $^{EU}/_{ml}$

شماره	نوع باکتری	غلظت اندوتوکسین
۱	اشرشیا کلی	۱۵/۳
۲	اشرشیا کلی	۷/۶
۳	اشرشیا کلی	۷/۶
۴	پسودوموناس آئروژینوزا	۷/۶
۵	اشرشیا کلی	۳/۸
۶	آنتروباکتر آئروژنز	۳/۸
۷	اشرشیا کلی	۳/۸
۸	اسینتوباکتر کاکلواستیکوس	۳/۸
۹	آنتروباکتر آئروژنر	۱/۹۲
۱۰	اشرشیا کلی	۰/۹۶
۱۱	کلبسیلا پنومونیه	۰/۹۶
۱۲	کلبسیلا پنومونیه	۰/۴۸
۱۳	آنتروباکتر آئروژنز	۰/۴۸
۱۴	کلبسیلا پنومونیه	۰/۳۴
۱۵	آنتروباکترآئروژنز	۰/۱۲

Mean ± SEM : ۳/۸۹ ± ۱/۰۸ $^{EU}/_{ml}$

نتایج تعیین حساسیت باکتریها نسبت به آنتی بیوتیک ها مشخص نمود که در باکتریهای گرم منفی بیشترین موارد حساسیت باکتریها نسبت به سیپروفلوکساسین (۱۰۰٪) و سفتازیدیم (۸۸٪) بود و در باکتریهای گرم مثبت وانکومایسین (۹۸٪) و سفوتاکسیم (۸۱٪) بیشترین درصد حساسیت را به خود اختصاص دادند .

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 2:58 IRDT on Saturday May 15th 2021

لازم به ذکر است جهت توصیف یافته ها از روشهای آماری توصیفی ، تهیه جداول توزیع فراوانی ، رسم نمودار، فرمول مقایسه دو نسبت و برآورد فراوانی های نسبی استفاده شد .

جدول ۲ : مقایسه نتایج کشت خون مثبت و LAL-test در باکتریهای گرم منفی به تفکیک نوع باکتری

باکتری	کشت خون مثبت	LAL-test مثبت	LAL-test منفی
اشرشیا کلی	۶	۶	–
آنتروباکترائروژنز	۵	۴	۱
کلبسیلاپنومونیه	۴	۳	۱
پسودوموناس ائروژنوزا	۱	۱	–
اسینتوباکترکاکلواستیکوس	۱	۱	–
جمع	۱۷	۱۵	۲

جدول ۳ : مقایسه نتایج کشت خون مثبت و LAL-test در باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی

باکتری	کشت خون مثبت	LAL-test مثبت	P value
باکتریهای گرم منفی	۱۷	۱۵	>٪۵
باکتریهای گرم مثبت	۲۱	۱	<٪۵
جمع	۳۸	۱۶	

نتیجه گیری

لیپوپلی ساکارید باکتریهای گرم منفی به عنوان مهمترین توکسین در ایجاد شوک عفونی مورد توجه و بررسی محققین قرار گرفته است . مرگ و میرهای مرتبط با شوک عفونی ۶۰-۳۵ درصد گزارش شده اند و می توان این بیماری را سیزدهمین عامل مرگ در دنیا محسوب کرد . اثبات عفونت ناشی از باکتریهای گرم منفی در خون از طریق فاکتورهای کلینیکی ساده مشکل می باشد، به طوری که در ایالات متحده تشخیص بیماری توسط پزشکان به بیش از ۴۰ درصد نمی رسد [۱۰].

لذا سالهای متمادی است که پزشکان در تلاش برای تشخیص سریع وجود اندوتوکسین در خون بیماران مبتلا به باکتریمی ناشی از باکتریهای گرم منفی می باشند تا از این طریق درمان های آنتی بیوتیکی اختصاصی در مراحل اولیه بیماری شروع شود و قدرت اثر بخشی آنها افزایش یابد . داروهای جدیدی نیز مانند آنتی بادی های منوکلونال ضد اندوتوکسین ابداع شده اند که باید بلافاصله پس از آغاز علایم بیماری تجویز گردند و با توجه به اینکه نتایج کشت خون حداقل ۳-۲ روز بعد از نمونه گیری مشخص می شود و برای تشخیص اندوتوکسمی نیز کافی نمی باشد ضرورت دسترسی به یک روش تشخیصی سریع و آسان در مراحل ابتدایی بیماری آشکار می گردد [۱۱،۱۲].

Levin در سال ۱۹۷۰ ، با استفاده از تحقیقات دکتر Bang آزمایش لیمولوس را ابداع نمود و آن را به عنوان یک روش حساس و سریع جهت تشخیص اندوتوکسین جایگزین روشهای قدیمی نمود [۱۳].

هدف از این تحقیق ، ارزیابی آزمایش لیمولوس در تعیین اندوتوکسین خون مبتلایان به باکتریمی ناشی از باکتریهای گرم منفی و نتیجتاً شناسایی سریع باکتریمی بود و با توجه به اینکه بیماران همودیالیزی نیاز به تشخیص و درمان سریع عفونت های باکتریایی دارند، می توان در صورت بدست آوردن ارتباط مناسب با نتایج کشت خون از این آزمایش برای تشخیص استفاده کرد .

در این مطالعه ۱۷ مورد باکتریمی ناشی از باکتریهای گرم منفی شناسایی گردید و LAL-test در مورد آنان انجام شد . ۱۵ نمونه دارای تست مثبت اندوتوکسین بودند (۸۸٪) ، در مطالعه Levin این نسبت ۷۷ درصد گزارش شد [۱۳].

جهت تعیین میانگین سطح اندوتوکسین ، طبق دستور العمل موجود در کیت به روش تیتراسیون ، غلظت اندوتوکسین آزاد شده در خون در هر یک از نمونه ها تعیین و میانگین آن $۳/۸۹ \pm ۱/۰۸ \ {}^{EU}/_{ml}$ به دست آمد .

Danner در یک مطالعه غلظت اندوتوکسین را در بیماران خود با علائم بالینی مشابه مطالعه حاضر ۰/۴ ± ۴/۴ گزارش نمود [۱۳].

جهت تعیین حساسیت و ویژگی تست ، نمونه پلاسمای بیماران مبتلا به باکتریمی ناشی از باکتریهای گرم مثبت نیز مورد آزمایش قرار گرفت و با توجه به مقایسه تست با کشت خون به عنوان استاندارد طلایی ، حساسیت ۸۸٪ و ویژگی ۹۵٪ به دست آمد .

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 2:58 IRDT on Saturday May 15th 2021

در مطالعه Peaeson (۱۹۹۵) حساسیت ۹۰٪ و ویژگی ۹۵٪ و Shnep (۱۹۹۸) حساسیت ۹۰٪ و ویژگی ۸۱٪ را به دست آوردند [۹].

Van Deventer در مطالعه مشابهی حساسیت ۷۹٪ و ویژگی ۹۶٪ را گزارش کرد [۹].

مقایسه نتایج حاصل از کشت خون و LAL در باکتریهای گرم منفی ، از نظر آماری تفاوت معنی داری را نشان نداد . ولی این تفاوت در مورد کوکسی های گرم مثبت معنی دار بود ($P < ۰/۰۵$).

در مطالعه Danner (۱۹۹۱) و Hurley (۱۹۹۴) نتایج حاصل از کشت خون و LAL در باکتریهای گرم منفی تفاوت معنی داری را نشان نداد [۱۳].

لذا مطالعه حاضر با نتایج حاصل از دو تحقیق اخیر مطابقت دارد . در مطالعات مشابهی که جهت ارزیابی تعیین سطح اندوتوکسین در تشخیص باکتریمی ناشی از باکتریهای گرم منفی انجام شده نتایج مثبت و منفی کاذب نیز ذکر شده است که گهگاه در آزمایش تداخل ایجاد می کنند .

موارد مثبت کاذب عبارتند از :

۱- در عفونت های موضعی ناشی از باکتریهای گرم منفی ، احتمال آزاد شدن اندوتوکسین در خون بدون باکتریمی وجود دارد [۱۰].

۲- نارسایی حاد شکم نیز یک پدیده شایع بوده که در اثر جابجایی اندوتوکسین از دستگاه هاضمه به خون در اندوتوکسمی روده ای بدون باکتریمی به اثبات رسیده است [۱۰].

۳-واکنش مثبت گلوکان دیواره سلولی قارچها به آزمایش لیمولوس ، به طوری که Bates در مطالعه خود وجود عفونت های قارچی را به وسیله آزمایش لیمولوس شناسایی نمود [۱۰].

۴- حضور اندوتوکسین در محیط ، آلودگی ظروف و ابزار مورد نیاز و عدم رعایت تکنیک های استریل در جمع آوری نمونه ها مثبت کاذب در آزمایش ایجاد می کند [۱۰].

۵- موارد مثبت در اثر مصرف داروهای گوگردی نیز گزارش شده است [۱۰].

در این مطالعه ابزار و لوازم مورد نیاز با روش ذکر شده در دستورالعمل کیت ، عاری از اندوتوکسین گردید و آلودگیهای محیطی به حداقل رسانده شد ، سپس جهت اطمینان در هر سری از آزمایشات یک نمونه کنترل منفی قرار داده شد . همچنین تا حد امکان سعی شد بیماران مورد مطالعه فاقد علایم گوارشی ، عفونت های موضعی و قارچی می باشند .

نتایج منفی کاذب عبارتند از :

۱- تعداد معدود باکتری در خون که نتوانسته است اندوتوکسین قابل ملاحظه ای در سطح حساسیت آزمایش آزاد کند [۱۰].

۲- حضور ممانعت کننده های پلاسمایی به علت عدم تأثیر مناسب روشهای به کار رفته در خارج کردن آنها از محیط ، منجر به ایجاد نتایج منفی کاذب می گردد [۱۰].

۳- در بعضی از بیماریها ، دوره های گذرایی از اندوتوکسمی همراه با پاکسازی و تصفیه سریع اندوتوکسین از خون وجود دارد که منجر به عدم شناسایی اندوتوکسین می گردد [۱۰].

در مطالعه حاضر جهت حذف ممانعت کننده های پلاسمایی از بین روشهای متفاوت ، روش حرارتی – رقتی (Dilosion-heating) انتخاب شد که بر اساس مطالعات اخیر و همچنین تجربیات به دست آمده در این تحقیق بهترین روش حذف کنندگی می باشد [۹].

نتیجه گیری

نظر به اینکه آزمایش لیمولوس در زمانی کمتر از دو ساعت جواب می دهد ، به عنوان یک روش سریع و قابل اعتماد در شناسایی بیماران مبتلا به باکتریمی قابل استفاده می باشد و متعاقب این مسئله پزشکان می توانند جهت درمان اختصاصی و سریع بیماران از آنتی بادیهای منوکلونال ضد اندوتوکسین استفاده نمایند .

همچنین از مزایای مهم این تست می توان عدم نیاز به حضور باکتری زنده ، افتراق بین باکتریمی ناشی از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی در ابتدای بیماری جهت درمان ، تشخیص اندوتوکسین در اوایل بیماری که تعداد باکتری ها کم می باشد و حساس و اختصاصی بودن و دسترسی سریع پزشکان به نتایج را نام برد [۸،۱۴،۱۱].

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 2:58 IRDT on Saturday May 15th 2021

References

1- Emil A . Tanagho ,Jack W, Mcaninch . ***Smith's General Urology*** 15 th ed, Mc Graw-Hill. co, companies 2000 ; 605-614 .

2- William L . Henrich . Principles and Practice of Dialysis . A Wolters kluwer company 2nd ed 1999 ; 43-49 .

3- John . T . Daugirdas . Todds . Ing . ***Hand book of Dialysis*** . 3nd ed . Little , Brown company . 1998 ; 50-150.

4- Bailey scott's . ***Diagnostic Microbiology*** . 17 th ed, Mosby , 2002 ; 865-874.

5- Kenneth T. ***Text book of Bacteriology*** . uw-Madison Department of Bacteriology , 2002.

6- David W.Bates . ***Limulus Amebocyte Lysate Assay for Detection of Endotoxin in Patients with Sepsis Syndrome*** . CID 1998 ; 27 : 582-591.

7- Connie R.Mahon , George M. ***Text book of Diagnostic Microbiology***. 2 th ed, W.B Saunders company 2000 ; 997-1007.

8- Blechova R.D.pivodova : ***LAL test-an Alternative Method of Detection of Bacterial Endotoxin*** . Acta Vet.Brno 2001; 70: 291-296.

9- Robert I, Roth Francine C. Levin***. Optimization of Detection of Bacterial Endotoxin in Plasma with the Limulus Test*** . J Lab Clin Med 1999;116: 153-61.

10- Mandell, Douglas, ***Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.*** 16 th ed, Philadelphia, 2005.

11- Baumgartner J-D. Heumann D. ***The HA-JA Monoclonal Antibody for Gram-Negative Sepsis***. N E J Med 1999;325 :281-20.

12- Greenman RL.sche in RMH. ***A Chtrolled Clinical Trial of E5 Murine Monoclonal IGm Antibody to Endotoxin in the Treatment of Gram Negative Sepsis.*** JAMA 1995; 266: 1097-102.

13- Dagata. parsonnet. ***Hospital-Acquired Infection Among Chronic Hemodialysis Patients***. Am J of kidney Diseases.2000; 35: 1083-1088.

14- Antonia G.Emilia. L. ***Catheter Salvage in a Patients on Hemodialysis with Catheter-Related Bacteremia by Pseudomonas***. Am J Nephrol 2001; 20: 496-497.

.