

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

دکتر حاجیه قاسمیان صفائی^۱، دکتر رحمت الله یزدانی^۲، دکتر فرح تاج نواب اکبر^{۳*}، ژینا وزیر زاده^۴

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 اندوتوكسین 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 اندوتوكسین خون در بیماران مبتلا به باکتریمی ناشی از باکتریهای گرم منفی به روش Limulus Amebocyte 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 اندوتوكسینی مورد توجه قرار گرفته است.

روش بررسی: مطالعه در سه 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 اندوتوكسین 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 اندوتوكسین خون بیماران $1/0.8 \pm 1/0.8$ $^{Eu}/ml$ به دست آمد و حساسیت روش به کار رفته 95% و ویژگی آن 95% 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 اندوتوكسین انجام پذیرد.

واژه های کلیدی: باکتریمی، اندوتوكسین، همودیالیز، LAL

مقدمه

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

*- ۴- نویسنده مسؤول - کارشناس ارشد میکروب شناسی، آدرس: سازمان تأمین اجتماعی - اصفهان

همراه: ۰۹۱۳۱۱۷۲۶۰۸، نمبر: ۰۳۱۱-۶۲۴۳۰۲۸

E mail: Vazirzadeh2006@yahoo.com

۱، ۲، ۳- استادیار گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان

تاریخ دریافت: ۸۴/۱۰/۱۵، تاریخ پذیرش: ۸۴/۱۰/۱۱

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 آندوتوكسین 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 آندوتوكسین ناشی از متلاشی شدن و لیز باکتریها کمک مؤثری در شناسایی بیماران می نماید.^(۶)

روش بررسی

این مطالعه توصیفی از مهر ماه 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 آندوتوكسین خون ۴ سی سی خون هپارینه از بیماران گرفته شد و پس از ساتریفوژ و جدا کردن پلاسمای ۲۰- درجه سیلیسیوس نگهداری شد. محیط های کشت خون روزانه کنترل شده و با توجه به مشاهدات ماکروسکوپی و ساب کالچر در محیط های EMB، بلاد آگار و شکلات آگار، باکتریهای بیماری زا به وسیله آزمایشات بیوشیمیایی افراطی از کشتهای خون مثبت ایزوله و شناسایی گردیدند. همچنین حساسیت باکتریهای آنتی بیوتیک های مورد مطالعه به وسیله روش کاربی باثر تعیین گردید.^(۷) جهت تعیین سطح آندوتوكسین خون بیمارانی که مبتلا به باکتریمی ناشی از باسیل های گرم منفی بودند از Limulus Amebocyte Lysate (LAL-test) استفاده شد. این روش بر اساس انعقاد یک پروتئین گرفته شده از سلولهای خونی خرچنگ لیمولوس به وسیله آندوتوكسین موجود در نمونه عمل می نماید.^(۸)

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 فاکتورهای مانند: دیالیزهای مستمر و طولانی مدت، ضعیف بودن سیستم ایمنی، بیماریهای زمینه ای، کاترگذاری و ایجاد فیستول جهت دسترسی به گردش خون بیمار، آلدگی 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 تا ۷۰۰۰۰ 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 صفوای و ادراری می باشد.

باکتریمی ناشی از باکتریهای گرم منفی به علت آزاد شدن ماده ای به نام لیپولی ساکارید یا آندوتوكسین 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 آپشاری کمپلمان، فعال سازی آپشار انعقادی و همچنین تحریک تکثیر Bcell می شود. تأثیر مجموعه این عوامل در بدن ایجاد التهاب، انقاد داخل عروقی، خونریزی و شوک سپتیک می کند که نهایتاً منجر به مرگ بیمار می شود.^(۴,۵) لذا تشخیص سریع و به

$$\text{مثبت حقیقی : } a = ۱۵/۱۷ = ۸۸\% \quad \text{مثبت کاذب : } b = ۱/۱۷ = ۵\%$$

$$\text{منفی کاذب : } c = ۲۰/۲۱ = ۹۵\% \quad \text{ویژگی : } \frac{d}{b+d} = \frac{۱}{۲۱} = ۵\%$$

منفی حقیقی : d

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 ییماران همودیالیزی مشخص شد که باکتری غالب در باسیل های گرم منفی ارششیا کلی (۳۵٪) و در کوکسی های گرم مثبت استافیلوکوک اورئوس (۴۲٪) بود.

جدول ۱: نتایج حاصل از تعیین سطح اندوتوكسین به تفکیک نوع باکتری بر حسب EU/ml

شماره	نوع باکتری	غلظت اندوتوكسین
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 آئروژنر	۳/۸
۷	اشرشیا کلی	۳/۸
۸	اسیتوباکتر 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 آئروژنر	۰/۴۸
۱۴	کلبسیلا پنومونیه	۰/۳۴
۱۵	آنتروباکتر آئروژنر	۰/۱۲

Mean \pm SEM : $۳/۸۹ \pm ۱/۰۸$ EU/ml

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

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

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 et al (۸۰۹)). استفاده شد.

سطح اندوتوكسین 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 اندوتوكسین که مثبت شده است.

Hard gel = (+)

Absence of gel = (-)

نتایج

نتایج حاصل از انجام آزمایشات باکتریولوژیک در مورد کشت خون ییماران 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 اندوتوكسین 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 $۳/۸۹ \pm ۱/۰۸$ (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٪ ویژگی آن ۹۵٪ به دست آمد.

محاسبه:

بیویتکی اختصاصی در مراحل اولیه بیماری شروع شود و قدرت اثر بخشی آنها افزایش یابد. داروهای جدیدی نیز مانند آنتی بادی های منوکلونال ضد آندوتوكسین ابداع شده اند که باید بلافاصله پس از آغاز علایم بیماری تجویز گردد و با توجه به اینکه نتایج کشت خون حداقل ۲-۳ روز بعد از نمونه گیری مشخص می شود و برای تشخیص آندوتوكسینی نیز کافی نمی باشد ضرورت دسترسی به یک روش تشخیصی سریع و آسان در مراحل ابتدایی بیماری آشکار می گردد^(۱۱،۱۲).

Bang Levin در سال ۱۹۷۰، با استفاده از تحقیقات دکتر آزمایش لیمولوس را ابداع نمود و آن را به عنوان یک روش حساس و سریع جهت تشخیص آندوتوكسین جایگزین روش های قدیمی نمود^(۱۳).

هدف از این تحقیق، ارزیابی آزمایش لیمولوس در تعیین آندوتوكسین 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 آندوتوكسین بودند (۸۸٪)، در مطالعه Levin این نسبت ۷۷ درصد گزارش شد^(۱۳).

جهت تعیین میانگین سطح آندوتوكسین، طبق دستور العمل موجود در کیت به روش تیتراسیون، غلظت آندوتوكسین آزاد شده در خون در هر یک از نمونه ها تعیین و میانگین آن 10.8 ± 3.89 EU/ml.

Danner در یک مطالعه غلظت آندوتوكسین را در بیماران خود با علائم بالینی مشابه مطالعه حاضر 4.4 ± 0.4 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.

لازم به ذکر است جهت جهت توصیف یافته ها از روش های 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 باکتریهای گرم منفی به تفکیک نوع باکتری

LAL-test منفی	LAL-test مثبت	کشت خون مثبت	باکتری
-	۶	۶	اشرشیا کلی
۱	۴	۵	آنتروبیاکتر اثر وژنر
۱	۳	۴	کلبیسیلا پنومونیه
-	۱	۱	پسودوموناس
-	۱	۱	اژرو ژنوزا
۲	۱۵	۱۷	اسیتوبیاکتر کاکلواستیکوس
جمع			

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

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

نتیجه گیری

لیپولی 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 ۳۵-۶۰ 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 متعدد است که پزشکان در تلاش برای تشخیص سریع وجود آندوتوكسین در خون بیماران مبتلا به باکتریمی ناشی از باکتریهای گرم منفی می باشند تا این طریق درمان های آنتی

در این مطالعه ابزار و لوازم مورد نیاز با روش ذکر شده در دستورالعمل کیت ، عاری از اندوتوكسین گردید و آلدگیهای 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 باشد .

نتایج منفی کاذب عبارتند از :

۱- تعداد محدود باکتری در خون که نتوانسته است اندوتوكسین قابل ملاحظه ای در سطح حساسیت آزمایش آزاد کند ^(۱۰) .

۲- حضور مانع 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 اندوتوكسین همراه با پاکسازی و تصفیه سریع اندوتوكسین از خون وجود دارد که منجر به عدم شناسایی اندوتوكسین می گردد ^(۱۰) .

در مطالعه حاضر جهت حذف مانع کننده های پلاسمایی از بین روشهای متفاوت ، روش حرارتی - رقتی (Dilution-heating) انتخاب شد که بر اساس مطالعات اخیر و همچنین تجربیات به دست آمده در این تحقیق بهترین روش حذف کننده 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 اندوتوكسین 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 اندوتوكسین 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، ۱۱، ۱۴) .

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

در مطالعه مشابهی Van Deventer (۹) ۹۶٪ را گزارش کرد .

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 ^(۱۰) .

در مطالعه Danner (۱۹۹۱) و Hurley (۱۹۹۴) نتایج حاصل از کشت خون و LAL در باکتریهای گرم منفی تفاوت معنی داری را نشان نداد ^(۱۱) .

لذا مطالعه حاضر با نتایج حاصل از دو تحقیق اخیر مطابقت دارد . در مطالعات مشابهی که جهت ارزیابی تعیین سطح اندوتوكسین 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 اندوتوكسین در خون بدون باکتریمی وجود دارد ^(۱۰) .

۲- نارسایی حاد شکم نیز یک پدیده شایع بوده که در اثر جایگایی اندوتوكسین از دستگاه هاضمه به خون در اندوتوكسین روده ای بدون باکتریمی به اثبات رسیده است ^(۱۰) .

۳- واکنش مثبت گلوكان 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 اندوتوكسین در محیط ، آلدگی 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) .

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*. NE J Med 1999;325 :281-20.
- 12- Greenman RL.sche in RMH. *A Chrtrolled 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.