维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)02-0208-03

羊膜制备与保存中的微生物安全性研究

张 琪[1],赵 敏[1],陈淑惠[2],刘明方[2],胡 柯[1],鲁 静[1],秦应祥[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016;2. 重庆医科大学临床微生物教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨人羊膜在制备和保存过程中的微生物安全性及其控制,为建立羊膜库提供便捷、有效的微生物控制方法。方法:20 只剖宫产胎盘的羊膜取材后,均按不同的无菌处理程序和不同保存方法分组,检测时段为保存后 24h、1 月、3 月、12 月,均作细菌、真菌、支原体检测。5 只顺产胎盘的羊膜,作细菌、真菌、乳酸菌、支原体检测。随访提供羊膜的 25 名产妇 6 个月,复查血清学。结果:仅用无菌生理盐水浸泡组中,2 只胎盘的羊膜出现细菌污染;20 只剖宫产胎盘的羊膜在其余各组中均未查出微生物污染;1 只顺产胎盘的羊膜出现乳酸菌污染。25 名产妇 6 个月的血清学复查均为阴性。结论:来源于健康产妇剖宫产胎盘的羊膜经抗生素液规范化无菌处理后,现今常用的保存方法可基本保证羊膜在 1 年保存期内免受细菌、真菌和支原体的污染。

【关键词】羊膜;制备;保存;微生物

【中国图书分类法分类号】R779.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-11-09

Study on microbial safety of HAM in preparation and preservation

ZHANG Qi, et al

(*Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the microbial safety of human amniotic membrane (HAM) in preparation and preservation, and to establish effective methods of microbe control for HAM bank. *Methods*: Human amnions were collected from elective caesarean sections in 20 healthy women, and divided into groups based on different sterilization procedures and preservation methods. Bacteria, fungi and mycoplasmas were detected at 24h, 1m, 3m and 12m after preservation. Other amnions collected in eutocia from 5 healthy women were detected bacteria, fungi, lactobacilli and mycoplasmas. The series of serological determination for the parturients were followed up in 6 months. *Results*: Two HAM samples only soaked in NS were detected to be contaminated with E. coli and/or S. epidermidis, respectively from two caesarean sections. There is no microbe detected in all of the amnions from caesarean sections which were soaked in the antibiotics solution. One HAM sample from eutocia was yet detected to have lactobacilli after soak. The series of serological determination were all negative. *Conclusion*: During one year storage, HAM only from caesarean sections in healthy women, can successfully avoid contamination if soaked in the antibiotics solution then prepared and preserved with aseptic technique.

【Key words】Human amniotic membrane (HAM); Preparation; Preservation; Microbe

自 1995 年 Kim 和 Tseng 用保存羊膜成功完成兔眼表重建术后,羊膜于眼科的应用得到飞速发展。在我国,眼表疾病发病率高,很多医院都自制羊膜并开展了羊膜移植手术。遗憾的是,对羊膜制品的微生物控制手段也相应出现较大的随意性。然而作为生物制品、作为移植的供体,羊膜的微生物安全性应有严格的质控标准。现今,羊膜的制备与保存方法众多,本实验旨在对这些常用方法的微生物安全性及其控制进行研究,为建立标准的羊膜库提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 羊膜来源及取材

随机选取 25 名健康产妇(年龄 25~35 岁),其中,剖宫产 20 名、顺产 5 名,产前母体均行血清学检查,排除人类免疫缺陷性病毒(HIV)、乙肝病毒(HBV)、丙肝病毒(HCV)、巨细胞病毒、疱疹病毒、弓形体、梅毒及其他传染病,羊水清亮。手术台旁等待,胎盘与胎儿分离后立即取胎盘置于无菌

作者介绍:张 琪(1976-),女,住院医师,硕士,主要研究方向:角膜病及眼表疾病。

基金项目:重庆市科委科学基金资助课题(渝科委计:2003-23)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

盒中，转移至消毒操作间，无菌条件下用生理盐水冲洗尽胎盘上的血凝块，通过羊膜与绒毛膜间的潜在间隙钝性分离获取羊膜。

1.2 主要试剂和仪器

抗生素浸泡液 1：含 1000 U/ml 庆大霉素、2.5 μg/ml 两性霉素 B 的医用无菌生理盐水。抗生素浸泡液 2：含 2000 U/ml 庆大霉素、2.5 μg/ml 两性霉素 B 的医用无菌生理盐水。DMEM 培养基：将干粉（美国 Hyclone 公司）加入新制备的三蒸水，调节 pH 值为 7.2~7.4，滤过除菌，-20℃低温保存。纯甘油：分析纯级。肉汤基础培养基、改良 Sabouraud 培养基（液体）、支原体培养基（液体）、乳酸菌选择性培养基（LC）、琼脂平板培养基：均由重庆医科大学临床微生物教研室提供。仪器有超净工作台，医用超低温冰箱，37℃恒温孵箱，真空干燥机，鉴定及药敏测试仪（ATB Expression）等。

1.3 实验方法

1.3.1 剖宫产羊膜 在超净工作台上，每一只胎盘的羊膜均用无菌剪剪出 1cm² 小块共 78 份，随机分为 7 组。每片羊膜样本均用浸泡液浸泡 20min 后，密封保存于无菌瓶中。组 1~组 4 每组 6 片羊膜；其中，2 片接种于肉汤培养基作细菌检测、2 片接种于改良 Sabouraud 培养基作真菌检测、另 2 片接种于支原体培养基作支原体检测。组 5~ 组 7 每组 18 片羊膜，均分在 3 个保存时段检测。分组详见表 1。

1.3.2 顺产羊膜 在超净工作台上，每只胎盘的羊膜均用无菌剪剪出 1cm² 小块共 6 片。羊膜用抗生素浸泡液 1 浸泡 20min 后，分别作细菌、真菌和支原体检测（每种培养基检测 2 片羊膜样本）。

1.3.3 随访 产后 6 个月随访提供羊膜的 25 名产妇，作 HIV、HBV、HCV 等血清学复查。

2 结 果

2.1 大体观察

2.1.1 剖宫产羊膜 经组 1 方法处理，37℃恒温孵育 3 天后，2 只胎盘的羊膜共 4 支肉汤培养基混浊，而改良 Sabouraud 培养基澄清、支原体培养基不变色；延长观察期至接种后 7 天，真菌和支原体检测均为阴性。此 2 只胎盘的羊膜经其余 6 组方法处理后，3 种培养基均无异常变化。另 18 只胎盘的羊膜经以上 7 组方法处理、37℃恒温孵育 7 天后，细菌、真菌、支原体培养基均无阳性表现。

2.1.2 顺产羊膜 5 只胎盘中，1 只胎盘的羊膜其 2 支肉汤培养基混浊，真菌、支原体培养基均无阳性表现；另 4 只胎盘的所有检测均为阴性。

2.2 微生物鉴定

2.2.1 剖宫产羊膜 4 支混浊的肉汤基础培养基分属于 2 个胎盘，每个胎盘的 2 支培养基鉴定结果相同。

2.2.1.1 形态观察 胎盘 1：肉汤均匀混浊。涂片于光镜下观察，呈两种细菌表现：一种为革兰染色阳性（G^+）球菌，另一种为革兰染色阴性（G^-）杆菌。转种于普通琼脂平板，37℃恒温孵育，24h 后见菌落生长旺盛，呈两种表现：一种较小而凸，边缘整齐，白色；另一种较大而扁，光滑、湿润、灰白色。分别涂片观察：小而凸的白色菌落为 G^+ 球菌，呈葡萄状排列；另一种为 G^- 杆菌，两端钝圆，分散排列。将小而凸的白色菌落转种于血琼脂平板，孵育后见菌落生长，无溶血环。另一种菌落转种于麦康凯（MAC）琼脂平板，孵育后见菌落生长，粉红色、圆形、光滑、湿润。

胎盘 2：肉汤均匀混浊。涂片于光镜下观察，见一种 G^- 杆菌。在普通琼脂平板及 MAC 琼脂平板上的菌落生长情况，与胎盘 1 相似。

2.2.1.2 仪器鉴定 挑取已分离的菌落放入 2ml 0.85% NaCl 基物瓶中，制备混浊度相当于 0.5 Mc-Farland 的菌悬液，置于 ATB 系统自动反应 24h 后分析结果。

胎盘 1：大肠埃希菌（Escherichia. Coli）、表皮葡萄球菌（Staphylococcus. Epidermidis）

胎盘 2：大肠埃希菌（Escherichia. Coli）

2.2.2 顺产羊膜 2 支肉汤培养基的鉴定结果相同。涂片于光镜下观察，见一种 G^+ 杆菌，细长，分散及

表 1 剖宫产羊膜制备及保存分组

	浸泡液	保存方法	保存时间
组 1	无菌生理盐水	浸泡液 4℃保存	4h
组 2	抗生素浸泡液 1	浸泡液 4℃保存	4h
组 3	抗生素浸泡液 2	浸泡液 4℃保存	4h
组 4	抗生素浸泡液 1	DMEM -20℃保存	24h
组 5	抗生素浸泡液 1	纯甘油 4℃保存	1mon、3mon、12mon
组 6	抗生素浸泡液 1	纯甘油与 DMEM 1:1 混合-80℃保存	1mon、3mon、12mon
组 7	抗生素浸泡液 1	真空干燥 4℃保存	1mon、3mon、12mon

维普资讯 http://www.cqvip.com

短链状排列。转种于乳酸杆菌(lactobacilli)选择性培养基(LC),菌落生长。

2.3 随访

产后 6 个月的血清学复查,25 名产妇的 HIV、HBV、HCV 等检测均为阴性。

3 讨 论

对供体进行微生物安全性控制,对于防止供体的感染性疾病隐患向受体传播具有重要意义。

3.1 羊膜来源及取材的安全性控制

健康育龄女性的阴道菌群中乳酸菌属最常见,通常是非侵袭力的微生物,但少数情况下也可引起侵袭性疾病,如菌血症等[1]。本研究中,顺产胎盘的羊膜经抗生素液规范处理后仍难以避免乳酸菌污染。所以,考虑到阴道有大量的寄居微生物群,而剖宫产胎盘来源日益丰富,选择"健康"的剖宫产产妇就成为控制羊膜微生物安全的第一关。

产前母体要行血清学检查,HIV 因其特殊的"窗口期"越发受到关注。由于采血与感染之间正好存在短暂的病毒血症期,意味着一次常规的 HIV 抗体筛查可能会增加供体的不安全性。所以,羊膜在获得时与贮存 6 个月后进行供者血清学检测,是保证其微生物安全性的基本要求[2,3]。随着 HIV 的逐年递增,要警惕使用新近感染但尚未出现抗体反应的供体羊膜。

3.2 羊膜制备时抗生素液的选择

在医院的特殊环境中,即便母体健康、剖宫产取胎盘,也难以杜绝条件致病菌污染。大肠杆菌是能从生殖道和尿液中分离出的最常见 G^- 杆菌,凝固酶阴性葡萄球菌是人体皮肤粘膜正常菌群之一,都是条件致病的重要菌群[1]。本研究表明,在制备新鲜羊膜过程中,大肠杆菌和葡萄球菌是可能出现的主要污染细菌,而应用适当的抗生素液后可消除污染。所以,规范化的无菌处理十分必要,浸泡优于单纯的冲洗。

眼科对于此类抗生素液的配制,纷繁复杂,尚无统一标准[4-7]。青霉素、两性霉素 B、链霉素、不同浓度庆大霉素等抗生素的配比一直是争论焦点,尤以青霉素和氨基糖苷类的选择争论最为突出。

本研究用 1000 U/ml 庆大霉素与两性霉素 B 配制浸泡液从以下四方面显其优势:致敏性、耐药性、抗菌作用和配伍原则。(1)青霉素毒性很低,但任何剂量均可引发过敏反应,过敏性休克的发生率居各类药物首位。所以,经抗生素液处理后的羊膜植片可能因残留的青霉素,引发过敏事故。庆大霉素则少有致敏作用。(2)耐药性也是使用青霉素的一大缺陷[8]。目前,从住院或非住院患者分离的葡萄球菌株中,超过 90%的金黄色葡萄球菌都对青霉素耐药,表皮葡萄球菌的大多数菌株也对青霉素耐药[9]。而细菌对庆大霉素耐药性发生较慢且不稳定,并主要是普鲁威登菌和假单孢菌,而非羊膜制取过程中的常见污染菌。(3)从抗菌作用看,青霉素是主要对革兰氏阳性球菌起作用的窄谱抗生素;庆大霉素则为速效广谱杀菌剂,并有抗生素后效应(PAE)。庆大霉素抗菌谱广,体外对革兰氏阴性杆菌、90%以上金黄色葡萄球菌株和 75%以上表皮葡萄球菌株均有效[9];抗菌活性也强,对临床分离的常见菌种(如大肠杆菌、葡萄球菌等)90%抑制的最小浓度(MIC_{90})仅为 500 U/ml[9,10]。本研究证明,选用浓度仅为 1000 U/ml 的庆大霉素,足以避免羊膜在制备和保存过程中的细菌污染。(4)值得注意的是,虽然临床上常联合应用青霉素与氨基糖苷类治疗严重感染,但配伍原则是二者不应混在同一液瓶中使用,因为青霉素在体外会明显灭活氨基糖苷类药物[9]。所以,目前制备羊膜常用的青霉素与氨基糖苷类混合,可能并非最佳的抗生素浸泡液。

3.3 羊膜保存中的无菌控制

除了在羊膜的取材和制备过程中严把微生物关,保存过程中的无菌控制同样重要。纯甘油需高温煮沸 60min;DMEM 需滤过除菌,-20℃低温保存,临用前方与已消毒的甘油混合。羊膜样本置于无菌瓶中后盖紧瓶塞,要将瓶口于熔化的蜡烛油中停留数秒取出,以完成密闭蜡封。必须在超净工作台上完成严格的无菌操作。

本次研究的剖宫产羊膜除实验组 1 外,均未发现细菌、真菌、支原体污染,说明经我们配制的抗生素液正规无菌处理后,严格无菌操作下的常用羊膜保存方法,均可基本保证羊膜在 1 年保存期内免受细菌、真菌和支原体的污染。

结合本研究还可认为,含 1000 U/ml 庆大霉素、2.5 μg/ml 两性霉素 B 的医用无菌生理盐水作为制备羊膜时的抗生素浸泡液,不仅方便、廉价、安全,而且可有效达到眼库对制备羊膜的微生物质控标准,值得推广。当然,还要采取其他措施防止微生物污染,比如,在移植前复水是对羊 (下转第 235 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

IPE细胞（reIPE）[4]。

3.2.4 细胞因子FGF对转分化过程的调节作用 FGF家族的各种蛋白质在晶体发育过程中起着十分重要的作用，在来源于IPE细胞的晶状体再生过程中，作为FGF活化后信号转导通路的下游阶段，其受体FGFRs的作用也是必须的[8]。本实验在FGF的协同作用下观察到了IPE向LEC细胞的转分化过程，可认为FGF对上述过程具有一定的调节和促进作用。但是，该细胞因子对转分化过程的具体作用尚未阐明，作用机制也知之甚少，有待进一步研究。

本实验观察到了高等哺乳动物兔的IPE细胞向LEC细胞的转分化现象，和以往利用低等生物IPE细胞所进行的体外培养相比，还远未达到类似的研究程度，在体外培养中也没有发现转分化后的LEC细胞形成晶状体泡及其他晶状体样结构，这可能主要与物种差别有关，所需要的条件和时间也可能大相径庭。我们的实验只是提出了这样一种可能性，做了最初的探索，至于是否能通过改变有关条件来实现体外培养条件下的晶状体再生，以及再生过程如何调控，尚需大量的实验来论证。

参 考 文 献

[1] Hu DN, Ritch R, McCormick SA, et al. Isolation and cultivation of human iris pigment epithelium [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1992;33(8):2443-2453.

[2] 王兆艳，惠延年. 兔眼虹膜色素上皮细胞的组织培养与超微结构观察[J]. 中华眼底病杂志，2002;18(1):61-63.

[3] Kosaka M, Kodama R, Eguchi G. In vitro culture system for iris-pigmented epithelial cells for molecular analysis of transdifferentiation [J]. Exp Cell Res, 1998;245(2):245-251.

[4] Itoh Y, Eguchi G. In vitro analysis of cellular metaplasia from pigmented epithelial cells to lens phenotypes: a unique model system for studying cellular and molecular mechanisms of "transdifferentiation"[J]. Dev Biol, 1986;115(2):353-362.

[5] Masuda A, Eguchi G. Effects of thioureas, inhibitors of melanogenesis, on lens transdifferentiation of cultured chicken embryonic retinal pigment cell[J]. Dev Growth Differ,1982;24(2):589-599.

[6] Karasawa Y, Eguchi G. Changes in membrane glycoproteins of pigmented epithelial cells transdifferentiating into lens cells [J]. Dev Growth Differ, 1985;27(3):898-907.

[7] Eldridge CF, Bunge MB, Bunge RP, et al. Differentiation of axon-related Schwann cells in vitro. I. Ascorbic acid regulates basal lamina assembly and myelin formation[J]. J Cell Biol, 1987 Aug;105(2):1023-1034.

[8] Stolen, Griep. Disruption of lens fiber cell differentiation and survival at multiple stages by region-specific expression of truncated FGF receptors[J]. Dev Biol, 2000;217(2):205-220.

（上接第 210 页） 膜做进一步漂洗，术后全身或局部应用抗生素等。

（通讯作者：赵 敏 联系方式：重庆医科大学附属第一医院眼科，邮编 400016 E-mail:minzhao2002@yahoo.com.cn）

参 考 文 献

[1] Richard LS, Ronald SG. Infectious Disease of The Female Genital Tract, 4th ed [M]. Lippincott Williams & Wilkins Inc. and Shandong Science & Technology Press, 2004;1-12.

[2] Committee Microbiological Safety of Blood and Tissue for Transplantation. Guidance on the microbiological safety of human tissue and organs used in the transplantation. London: Department of Health.

[3] Gabric N, Mravicic I, Dekaris I, et al. Human amniotic membrane in the reconstruction of the ocular surface [J]. Doc Ophthalmol, 1999; 98(3):273-279.

[4] Lee SH, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial [J]. Am J Ophthalmol, 1997; 123(3):303-312.

[5] 陈家祺，周世有，黄 挺，等. 新鲜羊膜移植治疗严重的急性炎症期及瘢痕期眼表疾病的临床研究 [J].中华眼科杂志，2000; 36(1):13-16.

[6] 邹留河，徐 军. 羊膜联合自体穹隆结膜移植治疗睑球粘连的实验研究 [J]. 眼科研究，2002; 20(6):491-494.

[7] 李学东，孙秉基，徐锦堂，等. 羊膜移植术治疗兔重度角结膜碱烧伤后遗血管性角膜白斑 [J]. 眼科研究，1998; 16(2):115-117.

[8] Neu HC. The crisis in antibiotic resistance [J]. Science, 1992; 257:1064-1073.

[9] Joel GH, Lee EL. Goodman & Gilman′s The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed [M]. McGraw-Hill Education (Asia) Co. and People's Medical Publishing House, 2004; 915-955.

[10] Freeman CD, Nicolau DP, Belliveau PP, *et al. Once-daily* dosing of aminoglycosides :review and recommendations for clinical practice [J]. J Amtimicrob Chemother, 1997; 39(5):677-686.