

# Amniyon Membran Saklama Solüsyonlarının Mikrobiyolojik İncelemesi

## Microbiological Examination of Amniotic Membrane Storage Media

Züleyha YALNIZ AKKAYA,<sup>a</sup>  
Hatice ULUDAĞ ALTUN,<sup>b</sup>  
Ayşe BURCU,<sup>a</sup>  
Emine Fırat GÖKTAŞ,<sup>c</sup>  
Çiğdem ATAMAN HATİPOĞLU,<sup>c</sup>  
Sami KINIKLI,<sup>c</sup>  
Firdevs ÖRNEK,<sup>a</sup>  
Ali Pekcan DEMİRÖZ<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Göz Hastalıkları Kliniği,  
<sup>c</sup>Enfeksiyon Hastalıkları ve  
Klinik Mikrobiyoloji Kliniği,  
Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi,  
<sup>b</sup>Tıbbi Mikrobiyoloji AD,  
Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Ankara

Geliş Tarihi/Received: 29.06.2014  
Kabul Tarihi/Accepted: 30.12.2014

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Züleyha YALNIZ AKKAYA  
Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi,  
Göz Hastalıkları Kliniği, Ankara,  
TÜRKİYE/TURKEY  
zyalniz@yahoo.com

doi: 10.5336/ophthal.2014-41207

Copyright © 2015 by Türkiye Klinikleri

**ÖZET Amaç:** Bu çalışmanın amacı, 1/1 oranında Dulbecco modifiye Eagle solüsyonu ve gliserol içeren amniyon membran saklama solüsyonlarının mikrobiyolojik incelemesini değerlendirmektir. **Gereç ve Yöntemler:** Toplam 64 adet amniyon membran saklama solüsyonunun mikrobiyolojik inceleme sonuçları değerlendirildi. Amniyon membran, hepatit B, hepatit C, sifiliz ve HIV 1-2 yönünden seronegatif gebelerden elektif sezaryen sırasında steril şartlarda alınan plasentadan hazırlandı ve 1/1 oranında Dulbecco modifiye Eagle solüsyonu ve gliserol içeren şişelere konuldu. Altmış dört adet şişenin hepsinden kapakları kapatılmadan önce steril insülin enjektörüyle 0,2 mL solüsyon alınarak kültür için mikrobiyoloji laboratuvarına gönderildi. Membranlar kullanılıncaya kadar şişeler -80°C'de saklandı. Kullanımdan önce amniyon membranların saklandığı şişelerden steril insülin enjektörüyle yaklaşık 0,2 mL solüsyon alınarak tekrar mikrobiyoloji laboratuvarına gönderildi. Örneklerin çikolata besiyeri ve "Eosin Methylene-blue" agara ekimleri yapıldı. Ekimi yapılan plaklar 37°C'de iki gün boyunca etüvde inkübe edildi. Kültürlerin üremeleri günlük olarak kontrol edildi. **Bulgular:** Amniyon membranın hazırlanması sırasında alınan 64 adet örneğin birinde metisiline duyarlı koagülaz negatif stafillokok üredi. Üreyen suş ampisiline dirençli, vankomisin, sefoksitin, siprofloksasin, linezolid, sefazolin, gentamisin ve klindamisinine duyarlı idi. Bu örneğin alındığı şişe imha edildi. Geriye kalan 63 adet saklama solüsyonunun 40'ından ameliyat esnasında yeniden numune alındı; birinde metisiline duyarlı koagülaz negatif stafillokok üredi. Üreyen suş ampisilin, vankomisin, sefoksitin, siprofloksasin, linezolid, sefazolin, gentamisin ve klindamisinine duyarlı idi. Bu amniyon membranın transplante edildiği ve profilaktik %0,3 ofloksasin damla verilen hastada ameliyat sonrası enfeksiyon gelişmedi. **Sonuç:** Amniyon membranların hazırlanması sırasında ve transplantasyon öncesinde kültür yapılması, kültürlerde üreme olması hâlinde, nakilden önce dokuların imhasına, nakilden sonra da uygun antibiyotik profilaksisine olanak vermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Amniyon; transplantasyon; doku nakli-transplantasyonu; göz enfeksiyonları

**ABSTRACT Objective:** The aim of this study was to investigate the microbiological examinations of amniotic membrane storage media, which is composed of 1/1 Dulbecco modified Eagle solution and glycerol. **Material and Methods:** The microbiological examination of 64 amniotic membrane storage media solutions was evaluated. Amniotic membrane was prepared from placentas which were obtained from hepatitis B, hepatitis C, syphilis and HIV 1-2 seronegative pregnant women during elective cesarean section and stored in 1/1 Dulbecco modified Eagle solution and glycerol. Samples of 0.2 mL solution were obtained, using a sterile insulin syringe, from all of the 64 vials before closing their covers and sent to the microbiology laboratory. The vials were stored at -80°C. Before use, 0.2 mL sample was taken using an insulin syringe and send again to microbiology laboratory. The samples were inoculated onto chocolate agar and "Eosin Methylene-blue" agar, and incubated at 37°C for two days. The plates were checked daily for growth. **Results:** Meticilline sensitive coagulase negative staphylococcus grew in one of 64 samples obtained during the preparation of amniotic membranes. The strain was ampicillin resistant, vancomycin, cefoxitin, ciprofloxacin, linezolid, cefazolin, gentamicin and clindamycin sensitive. The vial, from which this sample was taken, was destroyed. Preoperatively, new samples were obtained from 40 of the remaining 63 vials and in one sample methicillin sensitive coagulase negative staphylococcus grew. The growing strain was ampicillin, vancomycin, cefoxitin, ciprofloxacin, linezolid, cefazolin, gentamicin and clindamycin sensitive. Postoperative infection did not occur in the patient who received this membrane and used prophylactic 0.3% ofloxacin drops. **Conclusion:** Microbiologic examination of amniotic membrane storage media during preparation and before transplantation gives opportunity to destroy the tissues before transplantation and to give prophylactic or therapeutic antibiotic treatment when cultures are positive.

**Key Words:** Amnion; transplantation; tissue transplantation; eye infections

Türkiye Klinikleri J Ophthalmol 2015;24(1):18-21

**A** mniyon membran antifibrotik, antianjiyogenetik, antiinflamatuvar, antiproteolitik antimikrobiyal etkisi, epitelizasyonu hızlandırması ve biyolojik bandaj görevi görmesi nedeni ile çeşitli oküler yüzey hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır.<sup>1,2</sup> Amniyon membranının dondurularak veya liyofilize olarak saklanması mümkündür.<sup>3,4</sup> Bazı klinikler liyofilize amniyon membranları ticari kuruluşlardan satın almayı tercih ederken, bazıları da kendi kurumlarından temin ettikleri plasentalardan elde edilen amniyon membranları yıkama ve antisepsi işlemlerinden geçirdikten sonra -80°C’de dondurarak saklamayı tercih etmektedir. İkinci yöntemin uygulanması esnasında tüm önlemlerin alınmasına rağmen amniyon membranların kontamine olma ihtimali söz konusudur.<sup>5,6</sup>

Adds ve ark. sezaryen sırasında alınan amniyon membranların tümünün kontamine olduğunu bildirmişlerdir.<sup>5</sup> Aghayan ve ark. ise işlenmeden önce her bir vericiye ait amniyon membran için %61 olan kültür pozitifliğinin, yıkama ve antibiyotikli solüsyonlarla işlendikten sonra %84 oranında azaldığını göstermişlerdir, ancak işlem sonrası kültür pozitifliğinin oranını bildirmemişlerdir.<sup>6</sup> Amniyon membranlar küçük parçalara kesilip, ayrı ayrı şişelere konulup şişelerin kapakları kapatılmadan önce ve transplantasyondan hemen önce saklama solüsyonlarından alınan örneklerin mikrobiyolojik incelemesiyle ilgili literatürde yayına rastlanmadı. Bu nedenle bu çalışmayla, 1/1 oranında Dulbecco modifiye Eagle solüsyonu ve gliserol içeren şişelerde dondurularak saklanan amniyon membranların şişelere konduktan hemen sonra ve ameliyattan hemen önce saklama solüsyonundan alınan numunelerin mikrobiyolojik incelemesini değerlendirmeyi amaçladık.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma, etik kurul onayı alındıktan sonra Helsinki Deklarasyonu prensiplerine uygun olarak yapıldı. Şubat 2013-Temmuz 2013 tarihleri arasında mikrobiyolojik olarak incelenen toplam 64 adet amniyon membran saklama solüsyonunun sonucu geriye dönük olarak tarandı. Amniyon membran daha önceden tanımlanmış olan yöntemle göre ha-

zırlandı.<sup>3,7,8</sup> Plasenta hepatit B, hepatit C, sifiliz ve HIV 1-2 yönünden seronegatif gebelerden elektif sezaryen sırasında steril şartlarda alındı. Amniyon membran künt diseksiyonla koryondan ayrıldı ve steril serum fizyolojik ile yıkanarak kan pıhtılarından temizlendi. Ardından koryondan ayrılmış amniyon membran 50 mg/mL penisilin, 50 mg/mL streptomisin, 100 mg/mL tobramisin ve 2,5 mg/mL amfoterisin B içeren 500 mL steril serum fizyolojik içinde +4°C’de buzdolabında 24 saat bekletildikten sonra steril selüloz kâğıtlara epitel tarafı yukarı gelecek şekilde gergin olarak yapıştırıldı. Kâğıtlar 3x3 cm boyutlarında kesildi ve 1/1 oranında Dulbecco modifiye Eagle solüsyonu ve gliserol içeren şişelere yerleştirildi. Altmış dört adet şişenin kapakları kapatılmadan önce yaklaşık 0,2 mL solüsyon insülin enjektörüne alınarak, beklemeden mikrobiyoloji laboratuvarına gönderildi. Amniyon membran içeren şişeler kullanılıncaya kadar -80°C’de saklandı. Kullanımdan hemen önce amniyon membran şişeleri oda ısısında bekletilerek çözülmeye bırakıldı. Kullanılacağı sırada amniyon membran saklanan şişenin kapağı açıldıktan sonra steril insülin enjektörüyle yaklaşık 0,2 mL solüsyon alınarak beklemeden mikrobiyoloji laboratuvarına gönderildi. Örneklerin çikolata besiyeri ve “Eosin Methylene-blue” agara ekimleri yapılarak 72 saat 37°C’de iki gün inkübe edildi. Kültürlerin üremeleri günlük kontrol edildi.

## İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Amniyon membranların hazırlanması aşamasında üreme olan numune imha edildiği için ameliyat sırasında bu şişeden tekrar numune almak mümkün olmadığından, iki farklı dönemde elde edilen kültür sonuçlarını istatistiksel önemlilik testleriyle karşılaştırmak mümkün olmadı. Membranların nakledildiği olguların hiçbirinde enfeksiyon gelişmemiş olması istatistiksel önemlilik testi yapmayı olanaksız hâle getirdi. Bu nedenle sadece tanımlayıcı istatistikler sunuldu.

## BULGULAR

Amniyon membranlarının hazırlanması aşamasında alınan 64 (%1,56) adet örnekten birinde metisiline duyarlı koagülaz negatif stafilkok üredi.

Üreyen suş ampisiline dirençli, vankomisin, sefoksitin, siprofloksasin, linezolid, sefazolin, gentamisin ve klindamisine duyarlı idi. Bu örneğin alındığı amniyon membran imha edildi.

Geriye kalan 63 adet saklama solüsyonununun 40'ından ameliyat esnasında tekrar numune alındı, 1 (%2,5)'inde metisiline duyarlı koagülaz negatif stafilokok üredi. Üreyen suş ampisilin, vankomisin, sefoksitin, siprofloksasin, linezolid, sefazolin, gentamisin ve klindamisine duyarlı idi. Bu amniyon membranın transplante edildiği ve profilaktik %0,3 ofloksasin damla verilen hastada ameliyat sonrası enfeksiyon gelişmedi. Kültür negatif amniyon membran transplantasyonu yapılan 39 olguda da ameliyat sonrası enfeksiyon gelişmedi.

## TARTIŞMA

Amniyon membran transplantasyonu (AMT), çeşitli oküler yüzey hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.<sup>2</sup> Amniyon membran dondurularak veya liyofilize edilerek saklanabilmektedir.<sup>5,6</sup> Ekonomik olması, satın alma işlemlerine gerek kalmaması ve stokların daha kolay ayarlanabilmesi gibi avantajlara sahip olması nedeni ile ülkemizdeki birçok klinikte olduğu gibi kliniğimizde de kendi hazırladığımız dondurulmuş amniyon membranları kullanılmaktadır. Vajinal yolla yapılan doğumlardan elde edilen amniyon membranların daha çeşitli ve potansiyel olarak daha patojen mikroorganizmalar tarafından kontamine olması nedeni ile sadece sezaryenle yapılan doğumlar sırasında elde edilen plasentalar kullanılmaktadır.<sup>5</sup> Transplantasyon amacıyla alınan amniyon membranlardan en sık üretilen mikroorganizmalar koagülaz negatif stafilokoklardır.<sup>5,6</sup> Benzer şekilde bizim numunelerimizde de stafilokok üretilmiştir.

Azami dikkat gösterilmesine rağmen, amniyon membranların hazırlanması sırasında kontaminasyon söz konusu olabilir.<sup>5,6</sup> İnokülumun miktarı ve inoküle olan mikroorganizmanın virülansı, alıcının savunma sistemini ve kullanılan antibiyotik gü-

cünü aştığında sekonder enfeksiyonlar gelişebilmektedir. Klinik uygulamaları sırasında, AMT'ye bağlı sekonder enfeksiyonlar nadiren ortaya çıkmaktadır. Bunda, plasentanın sezaryen sırasında steril şartlarda temin edilmesi, steril ortamda yıkanması ve hazırlanması, antibiyotikli solüsyonlarda bekletilmesi, AMT sonrası profilaktik antibiyotik verilmesi, alıcının savunma sisteminin yanı sıra amniyon membranın sahip olduğu antimikrobiyal etkinin de rolü vardır.<sup>6,9</sup> Amniyon membran biyolojik bandaj görevi görmesinin, proteolitik enzimleri inhibe etmesinin ve epitelyasyonu hızlandırmasının yanı sıra antimikrobiyal etkisinin bulunması mikrobiyal keratitlerin tedavisinde faydalı olmasının nedenleridir.<sup>1,2</sup>

Ameliyat sırasında yapılan kültürlerin sonuçları AMT yapıldıktan sonra sonuçlanacağı için, olası postoperatif enfeksiyon durumunda üreyen mikroorganizmanın duyarlılık profili hastaya verilecek antibiyotik tedavisi için yol gösterici olmaktadır. Hazırlama aşamasında yapılan kültürlerde üreme olması hâlinde, üremenin olduğu şişenin imha edilmesi olası postoperatif enfeksiyonların önlenmesinde etkili olacaktır. Ancak, amniyon membranların hazırlanması sırasında veya kullanımlarından hemen önce mikrobiyolojik inceleme yapılması ile ilgili bir söz birliği bulunmamaktadır. Öte yandan, kültür pozitif olan korneaların naklinden sonra klinik olarak enfeksiyon görülme sıklığının düşük (%0-1,3) olduğunu gösteren çalışmalar mevcutken, kültür pozitif amniyon membranların naklinden sonraki enfeksiyon insidansı ile ilgili literatürde bir çalışmaya rastlanmadı.<sup>10-12</sup> Benzer şekilde, bizim kültür pozitif AMT yapılan olgumuzda da postoperatif dönemde enfeksiyon gelişmedi.

Sonuç olarak, amniyon membranların hazırlanması sırasında ve transplantasyon öncesinde, mikrobiyolojik olarak incelenmesi zorunlu olmasına rağmen, kültürlerde üreme olması durumunda nakilden önce dokuların imhasına; nakilden sonra da uygun antibiyotik profilaksisine olanak vermektedir.

## KAYNAKLAR

1. Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol* 2004;49(1):51-77.
2. Acer S, Yalnız Akkaya Z, Yalçın Tök Ö, Burcu A, Ömek F. [Amniotic membrane transplantation in corneal and conjunctival diseases]. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2012;32(3):609-17.
3. Kim JC, Tseng SC. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995;14(5):473-84.
4. Thomasen H, Pauklin M, Steuhl KP, Meller D. Comparison of cryopreserved and air-dried human amniotic membrane for ophthalmologic applications. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009;247(12):1691-700.
5. Addis PJ, Hunt C, Hartley S. Bacterial contamination of amniotic membrane. *Br J Ophthalmol* 2001;85(2):228-30.
6. Aghayan HR, Goodarzi P, Baradaran-Rafii A, Larjani B, Moradabadi L, Rahim F, et al. Bacterial contamination of amniotic membrane in a tissue bank from Iran. *Cell Tissue Bank* 2013;14(3):401-6.
7. Lee SH, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol* 1997;123(3):303-12.
8. Shimazaki J, Yang HY, Tsubota K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology* 1997;104(12):2068-76.
9. Wang X, Xie J, Tan L, Huo J, Xie H. Epithelium of human fresh amniotic membrane has antimicrobial effects in vitro. *Afr J Microbiol Res* 2012;6(21):4533-7.
10. Gomes JA, Dana MR, Dua HS, Goren MB, Laibson PR, Cohen EJ. Positive donor rim culture in penetrating keratoplasty. *Cornea* 1995;14(5):457-62.
11. Leveille AS, McMullan FD, Cavanagh HD. Endophthalmitis following penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 1983;90(1):38-9.
12. Wilhelmus KR, Hassan SS. The prognostic role of donor corneoscleral rim cultures in corneal transplantation. *Ophthalmology* 2007;114(3):440-5.