مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲۰، شماره‌ی ۸۱، مهر و آبان ۱۳۹۱، صفحات ۳۷ تا ٤٤

بررسی اثر آنتی باکتریال غشای آمنیوتیک انسان در شرایط متفاوت زمانی، دمایی وpH

دکتر محمد مهدی سلطان دلال[۱]، زهره کلافی[۲]، دکتر عبدالعزیز رستگار لاری[۱]، سید کاظم حسینی[۳]، دکتر عباس رحیمی فروشانی[۴]، دکتر زهرا دیلمی خیابانی[۵]، فرهاد نیکخواهی[۶]، سیامک حیدرزاده[۶]

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده‌ی بهداشت،گروه میکروب شناسی soltanirad34@yahoo.com

دریافت: ۹۰/۷/۲۱ پذیرش: ۹۱/۳/۸

چکیده

زمینه و هدف: *غشای آمنیوتیک انسان داخلی‌ترین لایه‌ی جفت می‌باشد که به دلیل حضور بتا دفنسین‌های انسانی و الافین‌ها دارای اثر ضدمیکروبی است. فعالیت‌های ضد میکروبی به شرایط و عوامل محیطی بستگی دارد. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر عوامل محیطی بر تغییر اثر آنتی‌باکتریال غشای آمنیوتیک انسانی در رابطه با سویه‌های استاندارد باکتریایی سالمونلا انتریکا BAA-۷۰۸، اشریشیا کلی ATCC۲۵۹۲۲، سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳، کلبسیلا پنومونیه ATCC ۷۸۸۱، انتروکوکوس فکالیس ATCC ۲۹۲۱۲ در آزمایشگاه بود.*

روش بررسی: *غشای آمنیوتیک از بانک پیوند اعضای بیمارستان امام خمینی از زنانی با سزارین انتخابی که از نظر تست‌های سرولوژیک HIV، HBV، HCV و سیفلیس منفی بودند، تهیه شد و در شرایط استریل به قطعات ۱/۵×۱/۵cm برش داده شد و سپس سوسپانسیون‌های نیم مک فارلند تهیه شده از باکتری‌ها روی محیط مولر هینتون آگار پخش گردید (در بررسی pH سه نوع محیط کشت تهیه گردید.) و در مرکز هر پلیت یک قطعه غشا قرار گرفت. نمونه‌ها به لحاظ متغیرهای دمایی (۲۵، ۳۳ و ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد) و زمانی (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) و pH (۶/۵، ۷، ۷/۵) بررسی شدند.*

یافته‌ها: *متغیرهای pH و زمان تأثیری دراثر ضد باکتریایی غشا نداشتند؛ اما دماهای ۲۵ و ۳۳ درجه‌ی سانتی‌گراد تنها در سودوموناس آئروژینوزا نسبت به ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد تغییر قابل توجهی را داشتند.*

نتیجه‌گیری: *اثر ضد باکتری غشای آمنیوتیک به جز مواردی خاص، از ثبات بالایی در برابر عوامل محیطی برخوردار است و این پایداری کاربرد آن را در عملکردهای بالینی و در شرایط مختلف گسترش خواهد داد.*

واژگان کلیدی: اثر ضدباکتری، عوامل محیطی، غشای آمنیوتیک انسان

۱- دکترای تخصصی میکروب شناسی، استاد مرکز تحقیقات مقاومت‌های میکروبی دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲- کارشناس ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
۳- کارشناس ارشد میکروب شناسی، بانک پیوند اعضای بیمارستان امام خمینی
۴- دکترای تخصصی آمار زیستی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران
۵- دکترای تخصصی زیست شناسی سلولی و مولکولی، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
۶- کارشناس ارشد میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

مقدمه

غشای آمنیوتیک انسانی یا آمنیون داخلی‌ترین لایه‌ی جفت می‌باشد (۱). غشای آمنیوتیک به طورطبیعی ۰/۰۲ تا ۰/۵ میلی‌متر ضخامت دارد که معادل ۶ تا ۸ لایه‌ی سلولی است و مساحت ۱۶۰۰ سانتی‌متر مربع را دارا می‌باشد. این غشا حفره‌ی آمنیوتیک را می‌پوشاند و سطح راسی داخلی آن در تماس با مایع آمنیوتیک است در حالی که سطح قاعده‌ای خارجی آن در تماس مستقیم با کوریون می‌باشد (۲). آمنیون انسان فاقد یاخته‌های ماهیچه‌ای صاف، اعصاب، عروق لنفاوی و مهم‌تر از همه فاقد عروق خونی است (۳). غشایی شفاف، محکم و نازک با قابلیت جداسازی آسان از کوریون می‌باشد (۴). غشای آمنیوتیک متشکل از یک لایه‌ی داخلی حاوی یاخته‌های اپی‌تلیالی است که بر روی یک غشای پایه قرار گرفته اند؛ غشای پایه نیز به نوبه‌ی خود توسط رشته‌هایی باریک به غشایی نازک از بافت همبند که دارای کلاژن‌های بینابینی I، III، V می‌باشد، اتصال یافته است (۵). بافت همبند، بافت مزانشیمی و غیرعروقی است که از سه لایه تشکیل شده است. لایه‌ی فشرده (Compact Layer) در کنار غشای پایه، لایه‌ی فیبروبلاست (Fibroblast Layer)، لایه‌ی اسفنجی (Spongy Layer). بنابراین غشای آمنیوتیک از ۵ لایه تشکیل شده است (۲). غشای آمنیوتیک انسان دارای اثر آنتی باکتریال می‌باشد (۶). غشاهای جنینی و جفت منابع مهمی از ضد میکروب‌های طبیعی موجود در رحم می‌باشند. ضد میکروب‌های طبیعی، پپتیدهایی هستند که ترکیبات ضروری از سیستم ایمنی ذاتی را تشکیل می‌دهند. بتا دفنسین‌های انسانی (HBDs) خانواده‌ی بزرگی از ضد میکروب‌های طبیعی جانوران مهره‌دار هستند. مطالعات، حضور بتا دفنسین‌های انسانی ۳-۱(HBD)، الافین، مهار کننده‌های پروتئازی لوکوسیت ترشحی (SLPI) را در لایه‌ی اپی‌تلیال آمنیون نشان داده‌اند. HBD-۲ مانند یک آنتی‌بیوتیک قوی می‌باشد که در پاسخ به IL-۱ در سلول‌های اپی‌تلیال آمنیون بیان می‌شود (۷). در زمان بارداری ضد میکروب‌های طبیعی در مایع آمنیوتیک تولید می‌شوند و در جفت، اندومتر رحم و غشاهای جنینی لوکالیزه می‌شوند (۸). اثر آنتی‌باکتریال غشای آمنیوتیک توسط جارگارد و همکاران در سال ۲۰۰۱ بر روی گستره‌ی وسیعی از باکتری‌ها شامل استرپتوکوکوس گروه A، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا نشان داده شده است (۹). فعالیت عوامل ضد میکروبی نه تنها به ساختارشان، بلکه به شرایط محیطی مانند pH نیز بستگی دارد. آلماجانو و همکاران در سال ۲۰۰۷، اثر pH را بر ویژگی ضد میکروبی ماده پلی‌فنول به عنوان محافظ مواد غذایی در برابر آلودگی‌ها ثابت کردند (۱۰). تالمی و همکاران در سال ۱۹۹۹ اثر دما را بر ویژگی ضد میکروبی غشای آمنیوتیک بررسی کردند (۱۱). با توجه به اثر آنتی‌باکتریال غشای آمنیوتیک بر روی گستره‌ی وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها (۹) و افزایش روز افزون فرم مقاوم باکتری‌ها بر داروهای رایج مورد استفاده در برابر آن‌ها (۱۲)، بررسی اثر احتمالی عوامل محیطی در تقویت اثر ضد باکتری غشای آمنیوتیک به عنوان ماده‌ی بیولوژیک به صورت یک ضرورت وجود دارد. هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی تأثیر عوامل محیطی (دما، زمان و pH) بر اثر آنتی‌باکتریال غشای آمنیوتیک انسان بر روی ۵ سویه‌ی استاندارد سالمونلا انتریکا BAA-۷۰۸، اشریشیا کلی ATCC ۲۵۹۲۲، سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳، کلبسیلا پنومونیه ATCC ۷۸۸۱، انتروکوکوس فکالیس ATCC ۲۹۲۱۲ در شرایط آزمایشگاهی بود.

روش بررسی

این بررسی از نوع توصیفی و به صورت مقطعی می‌باشد که طی ۶ ماه از تیر ماه الی آذر ماه ۱۳۸۹ در بخش میکروب‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گردیده است. جفت انسان در مدت زمان کوتاهی پس از یک عمل سزارین انتخابی از خانمی که به لحاظ

تست‌های سرولوژی HIV، HBV، HCV و سیفلیس منفی بود، تهیه شد. سپس در زیر هود با جریان لاملار، جفت با نرمال سالین شست و شو داده شد تا لخته‌های خون زدوده شوند. غشای آمنیوتیک داخلی از کوریون توسط بلانت کالبد شکافی جدا شد. غشای آمنیوتیک سه مرتبه با فسفات بافرسالین (PBS) حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کلوگزاسیلین ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، استرپتومایسین ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و آمفوتریسین B به مقدار ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر شست و شو داده شد. بدین طریق عوامل میکروبی در طی عمل زایمان و پس از آن رفع شد. تست‌های میکروب‌شناسی نیز بر روی غشا صورت گرفت (۱۲). تحت شرایط کاملا استریل در زیر هود، غشا به گونه‌ای که سطح اپی‌تلیالی آن به سمت بالا باشد بر روی سلیفون پهن شد و با نرمال سالین استریل شست‌وشو داده شد و توسط قیچی جراحی به قطعات تقریبی ۱/۵ × ۱/۵ سانتی‌متر مربع برش داده شد. در مرحله‌ی بعد سویه‌ی استاندارد سودوموناس آئروژینوزا (ATCC ۲۷۸۵۳) به‌صورت لیوفیلیزه از مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی بالینی دانشگاه علوم پزشکی شیراز به تهران منتقل شد و در محیط BHI کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. سویه‌های انتروکوکوس فکالیس (29212ATCC)، کلبسیلا پنومونیه (7881ATCC)، سالمونلاانتریکا (-708BAA) و اشریشیاکلی (25922ATCC) از بخش میکروب‌شناسی دانشکده‌ی بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران جمع‌آوری شد. هر ۵ سویه بر روی محیط بلاد آگار حاوی خون گوسفند ۵ درصد کشت داده شد و پس از۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، از هر یک سویه‌ها سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند تهیه گردید. در بررسی عامل دما، از هر یک از سوسپانسیون‌ها به‌صورت مجزا ۱۰۰ لاندا برداشته شد و بر روی محیط‌های مولر هینتون آگار (pH=۷/۵) ریخته و به صورت چمنی پخش شد و در مرکز هر یک از محیط‌ها یکی از قطعات غشای آمنیوتیک قرار داده شد (شبیه به بررسی خاصیت آنتی‌باکتریال در روش دیسک فیوژن در تست آنتی‌بیوگرام). سپس پلیت‌ها در سه انکوباتور با دماهای ۲۵، ۳۳ و۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌صورت جداگانه به‌مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون گردیدند. در بررسی عامل زمان تمام مراحل فوق انجام گردید با این تفاوت که ۵ پلیت کشت شده در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند و نتایج در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت انکوباسیون ثبت گردید. در مرحله‌ی مربوط به عامل pH، ابتدا محیط‌های مولر هینتون آگار با سه نوع pH متفاوت ۷،۷/۵ و ۶/۵ تهیه گردید و سپس همانند مراحل قبل، از هر یک از سوسپانسیون‌ها به‌صورت مجزا ۱۰۰ لاندا برداشته شد و بر روی محیط‌های مولر هینتون آگار ریخته و به صورت چمنی پخش شد و در مرکز هر یک از محیط‌ها یکی از قطعات غشای آمنیوتیک قرار داده شد و ۱۵ پلیت کشت شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. اندازه‌ی ۴ قطر از هر هاله‌ی عدم رشد توسط خط کش اندازه‌گیری شد و میانگین اقطار محاسبه گردید.

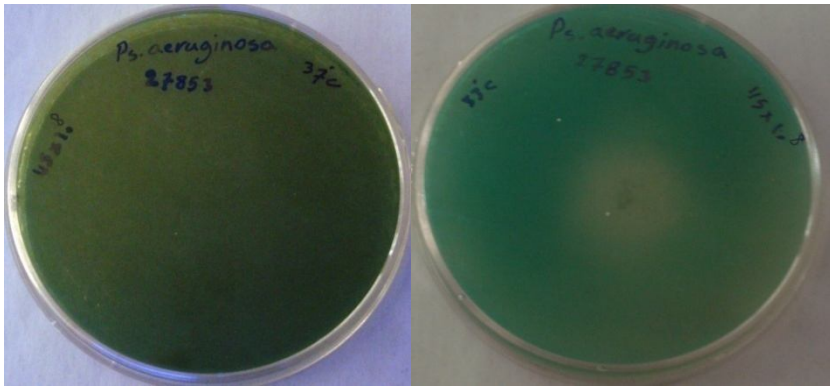
یافته‌ها

در بررسی هر سه عامل، ۲ سویه‌ی کلبسیلا پنومونیه و انتروکوکوس فکالیس نسبت به اثر ضد باکتریایی غشای آمنیوتیک مقاوم بودند و هیچ‌گونه هاله‌ی عدم رشدی در رابطه با این سویه‌ها رویت نشد (تصویر ۱)، اما سه سویه‌ی استاندارد دیگر نسبت به غشای آمنیوتیک حساس بودند و هاله‌ی عدم رشد در رابطه با آن‌ها رویت شد (در سودوموناس آئروژینوزا هاله عدم رشد بسیار باریک بود و به دلیل حضور پیگمان‌های پیوسیانین به سختی قابل مشاهده بود). در پلیت‌های مربوط به بررسی عامل زمان و pH تغییری در نتایج و همچنین قطر هاله‌ی عدم رشد در سویه‌های حساس مشاهده نشد (تصویر۲). در بررسی دما در رابطه با سویه

حساس سودوموناس آئروژینوزا قطر هاله‌ی عدم رشد در دمای ۳۳ و ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نسبت به ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد افزایش یافت و این هاله در ۳۳ درجه‌ی سانتی‌گراد به وضوح قابل رویت بود (تصویر ۳)؛ اما این افزایش قطر در دو سویه‌ی حساس دیگر (سالمونلا انتریکا و اشریشیاکلی) در هر سه بازه‌ی دمایی مورد بررسی مشاهده نشد. تغییر و عدم تغییر قطر هاله‌ی عدم رشد ۵ باکتری مورد بررسی در حضور متغیرهای دما، زمان و pH در جدول ۱ آورده شده است.

تصویر ۱: مقاومت به اثر آنتی باکتری غشای آمنیوتیک

تصویر۲: عدم تغییر هاله عدم رشد سالمونلا انتریکا در ۳ نوع pH متفاوت



تصویر ۳: اثر عامل دما در افزایش قطر هاله عدم رشد در سویه‌ی حساس سودوموناس آئروژینوزا

جدول ۱: اندازه‌ی هاله‌ی عدم رشد بر حسب میلی‌متر به طور میانگین در سویه‌های استاندارد باکتریایی در حضور متغیرهای دما، زمان و pH

متغیرها / نام باکتری	دما (°C)			زمان (h)				pH		
	۳۷	۳۵	۳۳	۷۲	۴۸	۲۴	۷/۵	۷	۶/۵
اشریشیا کلی	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰
سالمونلا انتریکا	۲۶	۲۶	۲۶	۲۶	۲۶	۲۶	۲۶	۲۶	۲۶
کلبسیلا پنومونیه	-	-	-	-	-	-	-	-	-
سودوموناس آیروژینوزا	۲	۵	۶	۲	۲	۲	۲	۲	۲
انتروکوکوس فکالیس	-	-	-	-	-	-	-	-	-

بحث

مطالعه‌ی حاضر اثر ممانعت کنندگی غشای آمنیوتیک را بر روی یک گستره‌ی خاصی از سویه‌های استاندارد باکتریایی مورد بررسی شامل؛ اشریشیاکلی (ATCC۲۵۹۲۲)، سالمونلا انتریکا (BAA-۷۰۸) و سودوموناس آئروژینوزا (ATCC۲۷۸۵۳) آشکار ساخت، این در حالی است که ۲ سویه‌ی استاندارد کلبسیلا پنومونیه (ATCC۷۸۸۱) و انتروکوکوس فکالیس (ATCC۲۹۲۱۲) به اثرضد باکتریایی غشای آمنیوتیک مقاومت نشان دادند. جارگارد و همکاران در سال‌های ۱۹۹۹ و ۲۰۰۱ اثر ضد باکتریایی غشاهای آمنیون و کوریون را برروی سویه‌های استرپتوکوکوس گروه A، استرپتوکوکوس‌های گروه B، استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس، انتروکوکوس فکالیس مورد بررسی قرار دادند و نتایج مطلوبی را به لحاظ ممانعت از رشد و اندازه‌ی هاله‌ی عدم رشد در استرپتوکوکوس گروه A، استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس گزارش کردند (۱۳و۹). نتایج آن‌ها تأییدکننده‌ی مشاهدات ما در رابطه با اثر ضد باکتریایی غشای آمنیوتیک انسان در ایجاد هاله‌ی عدم رشد می‌باشد. تالمی و همکاران نیز اثر ممانعت‌کنندگی غشای آمنیوتیک، غشای کوریوآمنیوتیک و غشاهایی بر اساس پلی‌اورتان سنتتیک را زمانی که روی پلیت‌های آگاری کشت شده با باکتری قرار می‌گیرند، اثبات کرده‌اند (۱۱). آلماجانو و همکاران در سال ۲۰۰۷، اظهار داشتند که فعالیت ضد میکروبی پپتیدهای طبیعی تنها به ساختارشان بستگی ندارد بلکه به شرایط و عوامل محیطی بستگی دارد و افزایش pH را در افزایش فعالیت ضد میکروبی ماده پلی فنول به اثبات رساندند (۱۰). در مطالعه‌ی حاضر عدم تغییر در قطر هاله‌ی عدم رشد در سویه‌های حساس حاکی از عدم تأثیر متغیر pH بر فعالیت پپتیدهای ضدمیکروبی غشای آمنیوتیک می‌باشد. تالمی و همکارانش در سال ۱۹۹۹، در بررسی اثر بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت انکوباسیون بر اثر ضدمیکروبی غشاهای آمنیون و کوریون برعلیه استرپتوکوکوس‌های گروه B، نتیجه‌ی منفی گزارش گردید (۱۱). در مطالعه‌ی حاضر نیز عامل زمان در بازه‌های زمانی فوق بر نتایج مربوط به اثر ضد باکتریایی غشا بر روی ۵ سویه‌ی استاندارد مورد بررسی تغییری را ایجاد نکرد که این امر حاکی از عدم تأثیر عامل زمان در اثر ضد باکتری غشا می‌باشد. مای و همکاران در سال ۱۹۴۶، اثر دمای ۳۰ و ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوباسیون را بر روی MIC وMBC

چندین آنتی‌بیوتیک مربوط به استافیلوکوکوس‌های مقاوم به متی‌سیلین یا پنی‌سیلین مطالعه کردند، مشابه با این مطالعه توسط هینکز و همکاران در سال ۱۹۹۷ انجام شد که اثر دمای انکوباسیون را روی MIC و MBC آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر بر دیواره‌ی سلولی استرپتوکوکوس فکالیس مورد بررسی قرار دادند، نتایج هر دو مطالعه حاکی از تأثیر دما بر میزان MIC و MBC آنتی بیوتیک‌ها بود (۱۵و۱۴). در مطالعه‌ی حاضر افزایش قطر هاله‌ی عدم رشد در دمای ۲۵ و ۳۳ درجه‌ی سانتی‌گراد نسبت به دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در سویه‌ی حساس سودوموناس آئروژینوزا، اثر دما را به عنوان عامل محیطی بر فعالیت پپتیدهای ضدمیکروبی غشای آمنیوتیک در رابطه با برخی از سویه‌های باکتریایی آشکار ساخت. مطالعات آینده می‌توانند در برگیرنده‌ی بررسی مکانیسم عمل پپتیدهای ضد میکروبی موجود در غشای آمنیوتیک انسانی بر علیه سویه‌های حساس باکتریایی و کاربرد این دانش در تولید داروهایی با اثر ضد میکروبی و عوارض جانبی کم‌تر نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک امروزی باشند.

نتیجه‌گیری

غشای آمنیوتیک انسانی ترکیبی بیولوژیک با اثر آنتی‌باکتریال نسبتاً پایدار در برابر عوامل محیطی مانند دما، زمان و pH می‌باشد؛ از این رو می‌توان در شرایط محیطی متفاوت از غشای آمنیوتیک به عنوان ماده‌ای با اثر ضد میکروبی پایا همراه با آنتی‌بیوتیک‌ها جهت تسریع درمان بیماری‌های بالینی بهره برد.

References

1- Barachetti L, Giudice C, Mortellaro CM. Amniotic membrane transplantation for the treatment of reline corneal sequestrum: Pilot Study. *Vet Ophthalmol*. 2010; 13: 326-30.

2- John T. Human amniotic membrane transplantation: Past, present, and future. *Ophthalmo Clin N Am*. 2003; 16: 43-65.

3- Toda A, Okabe M, Yoshida t, Nikaido T. The potential amniotic membrane/ amniotic derived cells for regeneration of various tissues. *J Pharmacol Sci*. 2007; 105: 215-28.

4- Ganatra MA. Amniotic membrane in surgery. *Journal of Pakistan Medical Association*. 2003; 53: 1-7.

5- Baradaran Rafiei AR, Aghayan HR, Arjmand B, Javadi MA, Barazandeh B. Amniotic membrane transplantation. *Bina J Ophthalmol*. 2006; 11: 531-52.

6- Barequet IS, Habot-Wilner Z, Keller N, et al. Effect of amniotic membrane transplantation on the healing of bacterial keratitis. *Investigative Ophthalmology Visual Science*. 2008; 49: 163-67.

7- King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave JM, Bocking AD, Challis JRG. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta*. 2007; 28: 161-9.

8- Stock SJ, Kelly RW, Riley SC, Calder AA. Natural antimicrobial production by the amnion. *Am Abstet J Gynecol*. 2007; 196: 255-61.

9- Kjaergaard N, Hein M, Hyttle L, et al. Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001; 94: 224-9.

10- Almajano MP, Carb´o R, Delgado ME, Gordon MH. Effect of ph on the antimicrobial activity and oxidative stability of oil-in-water emulsions containing caffeic acid. *J Food Sci*. 2007; 72: C258- C263.

11- Talmi YP, Sigler L, Inge E, Finkelstein Y, Zohar Y. Antibacterial properties of human amniotic. *Placenta*. 1991; 12: 285-8.

12- Beumer R, Bloomfield SF, Exner M, Fara GM, Nath KJ, Scott E. Microbial resistance and biocides. 2000. Avaiable from: URL: http://www. ifh- homehygiene.org.

13- Kjaergaard N, Helming RB. Chorioamniotic membranes constitute a competent barrier to group B streptococcus in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1999; 83: 165-9.

14- May JW, Houghton RH, Perret CJ. The effect of growth at elevated temperatures on some heritable properties of Staphylococcus aureus. *J Gen Microbiol*. 1964; 37: 157-69.

15- Hinks ET, Daneo- Moore LS. Temperature effects on minimum inhibitory and bactericidal constrations of cell wall antibiotics in Streptococcus faecalis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1977; 12: 281-3.

The Impact of Environmental Factors on the Antibacterial Properties of Human Amniotic Membrane *in vitro*

Soltan Dallal MM[1,2], Kalafi Z[3], Rastegare Lari A[1,2], Hosseini SK[4], Rahimi foroushani A[5], Deilami Khiabani Z[6], Nikkhahi F[6], Heidarzadeh S[1]

[1]Division of Microbiology, Dept. of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[2]Antimicrobial Resistant Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[3]Dept. of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.

[4]Transplant Bank, Imam Khomeini Hospital, Tehran, Iran.

[5]Dept. of Epidemiology and Biostatics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences Tehran, Iran.

[6]Biological Research Center, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran.

Corresponding Author: Soltan Dallal MM, Division of Microbiology, Dept. of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Email: soltanirad34@yahoo.com

Received: 13 Oct 2011 **Accepted:** 28 May 2012

Background and Objective: Human amniotic membrane, which is the innermost layer of placenta, contains beta defensins and elafin, which both have antibacterial properties. These antibacterial activities depend on the conditions and environmental factors. The purpose of this study was to evaluate the effect of environmental factors on human amniotic membrane antibacterial properties against *Klebsiella pneumonia* (ATCC7881), *Entrococcus faecalis* (ATCC29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Salmonella enteric* (BAA-708), and *E. coli* (ATCC25922) strains *in vitro*.

Materials and Methods: The amniotic membrane samples were obtained from caesarean women in Imam Khomeini hospital. Participating women were all seronegative for HIV, HBV, HCV, and syphilis. The samples were cut into 1.5×1.5 cm pieces. The 0.5 McFarland bacterial suspensions were prepared and spread on Muller-Hinton agar medium, and a piece of membrane was placed in the centre of each plate. Samples were examined at different time intervals (24, 48, and 72 hr), temperatures (25, 33, 37°C) and pH (6.5, 7, and 7.5) as variables.

Results: The results show that time and pH as variable parameters did not affect the antibacterial properties of the amniotic membrane. However, the change in temperature (25 and 33°C vs. 37°C) had a significant impact on *P. aeruginosa*.

Conclusion: Antibacterial properties of the amniotic membrane seem resistant against environmental factors, except for especial cases, and this sustainability could expand its usage in clinical procedures and different conditions.

Keywords: Human amniotic membrane, Antibacterial properties, Environmental factors