

·论著/眼视光新技术研发·

带细菌滤过装置的滴眼液瓶在自体血清治疗干眼中的应用

邸新 王国栋 张晓博 徐玲 何向东 何伟

【摘要】 目的 评估带有特殊细菌滤过装置的、无需添加防腐剂的滴眼液瓶装载的自体血清治疗干眼的安全性与有效性。**方法** 前瞻性队列研究。共纳入 60 例干眼患者,按随机数字表法分为 2 组。常规制备自体血清后,均不添加防腐剂,一组装载于带有特殊过滤装置滴眼液瓶(装置瓶组),另一组装载于普通瓶(普通瓶组)。开启后装置瓶使用期限为 14 d,普通瓶为 3 d。2 组参与者在用药前和用药后 2、4 周均行表面麻醉后的 Schirmer I 试验(主要疗效指标)、干眼症状问卷表、泪膜破裂时间和角膜荧光素染色检测来评估自体血清疗效。另采用家兔 60 只,2 组各 30 只,装置瓶和普通瓶自体血清开启后按常规方法给家兔点眼,使用后第 3、7、14、21 天行瓶中血清细菌培养检测污染率。数据分析采用重复测量的方差分析和基于秩次的重复测量方差分析。**结果** 30 瓶普通瓶中,第 3、7、14 与 21 天分别有 0、2、4、12 瓶污染;30 瓶装置瓶中,均未出现污染。4 周治疗时期内,2 组间表面麻醉后 Schirmer I 试验、干眼症状评分、泪膜破裂时间和角膜荧光素染色差异均无统计学意义。**结论** 带细菌滤过装置的滴眼液瓶可以有效降低自体血清污染风险,在不影响临床疗效的前提下延长单包装制剂使用期限。

【关键词】 干眼病; 自体血清; 眼药水瓶

Use of containers with sterilizing filters in autologous serum eye drops for the treatment of dry eye Di Xin, Wang Guodong, Zhang Xiaobo, Xu Ling, He Xiangdong, He Wei. Shenyang He Eye Hospital, Shenyang 110034, China

Corresponding author: He Wei, Email: hewei0111@163.com

【Abstract】 Objective To assess the effect of the use of containers with a sterilizing filter in autologous serum eye drops for the treatment of dry eye. **Methods** Sixty dry eye patients were recruited for this prospective cohort study. Autologous serum was kept in containers with a sterilizing filter for 30 patients and, for the other 30 patients, autologous serum was kept in conventional containers. Subjects completed the Schirmer I test (SIT, main outcome), ocular surface disease index (OSDI), fluorescein tear breakup time (BUT), and corneal fluorescein staining (CFS) at baseline, and 2 weeks and 4 weeks after treatment. During home therapy, it is recommended not to use the same conventional container for more than 3 days, and the same containers with a sterilizing filter for more than 14 days. Sixty rabbits were selected for contamination test. Containers with a sterilizing filter (30 rabbits) or conventional containers (30 rabbits) opened to give drops to rabbits. Contamination of autologous serum was tested at 3, 7, 14 and 21 days after use. A repeated measured ANOVA and Friedman repeated measured ANOVA on ranks were used for statistical analysis. **Results** In the group using conventional containers, contamination was found in zero bottle at day 3, 2 bottles at day 7, 4 bottles at day 14 and 12 bottles at day 21 while no contamination was found in containers with a sterilizing filter. No significant difference was found in SIT, OSDI score, BUT and CFS between the two groups during 4 weeks treatment. **Conclusion** Containers with an adapted filter can reduce the contamination rates in autologous serum eye drops and extend the use of autologous serum eye drops without affecting therapeutic efficacy.

【Key words】 Xerophthalmia; Autologous serum; Ophthalmic solutions containers

DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-845X.2015.07.004

基金项目:沈阳市科技支撑项目(F13-081-2-00)

作者单位:110034 辽宁省沈阳何氏眼科医院

通信作者:何伟,Email:hewei0111@163.com

自体血清不仅对眼表具有润滑作用,而且含有许多泪液中存在的活性因子,如:角膜上皮生长因子、维生素A、转化生长因子等,可以有效促进角膜上皮修复并改善泪膜黏液层的健康状况^[1]。自体血清已成为治疗严重干眼、眼表化学伤等眼表疾病的重要药物,但因保存困难且易被微生物污染其临床应用极大受限。既往文献多推荐使用同一包装自体血清不要超过7 d,甚至很多医生要求每日更换^[2-4]。基于自体血清在干眼治疗中的独特优势和巨大潜力,本研究评估了带有特殊细菌滤过装置的、无需添加防腐剂的滴眼液瓶装载的自体血清治疗干眼的安全性及有效性,期望这种方法可以降低自体血清污染风险,延长制剂使用期限。

1 对象与方法

1.1 对象

选择沈阳何氏眼科医院2013年11月至2014年1月诊断为干眼的门诊患者。且本研究经本院伦理委员会论证通过。入选标准:①眼表疾病指数(ocular surface disease index, OSDI) > 23分(OSDI中重度干眼诊断标准)^[5]。②泪膜破裂时间(break-up time, BUT) < 5 s。③角膜荧光素染色(corneal fluorescein staining, CFS)阳性。排除标准:全身免疫系统疾病患者;实验前1周内局部或全身使用过糖皮质激素、非甾体类抗炎药、免疫抑制剂者;眼表感染性炎症患者;妊娠或哺乳期妇女等。

患者根据随机数字表法分为2组,装载于带有特殊过滤装置滴眼液瓶(10 ml/支, Aptar, Illinois USA)的自体血清治疗组(装置瓶组)与装载于普通氧氟沙星滴眼液瓶的自体血清治疗组(普通瓶组)。本实验已通过沈阳何氏眼科医院伦理委员会论证,所有入选者均签署知情同意书。根据主要疗效指标Schirmer I试验(Schirmer I test, S I T)结果,显著性水平设为5%,检验效能设为90%,所需样本总量为60例,2组各入组30例。装置瓶组患者的平均年龄为(42.3±13.5)岁,普通瓶组平均年龄为(42.1±9.6)岁,2组年龄差异无统计学意义。装置瓶组男10例,女20例;普通瓶组男9例,女21例;2组间性别构成比差异无统计学意义($\chi^2=0.077, P>0.05$)。实验过程中各时间点均无失访病例。

1.2 装置瓶和普通瓶装载的自体血清污染情况评估

1.2.1 自体血清的制备 应用高压灭菌真空采血器抽取参与者肘前静脉全血20 ml,室温静置2 h后,3 500 r/min离心15 min,取上清,并用无菌生理盐

水(按1/4比例)稀释。血清分别装载于装置瓶或普通瓶中,棕色包装袋遮光保存,开启前-20℃保存,开启后4℃保存。

1.2.2 细菌培养 60只中华大耳白兔用于细菌培养,由辽宁何氏医学院实验动物中心提供,分为2组,各30只。装置瓶和普通瓶自体血清开启后,给家兔按常规点眼方法点眼,每天4次。在开启后3、7、14、21 d上午9时取开启的装置瓶和普通瓶中60 μ l自体血清滴眼液加到增菌液中,标准循环扩增24 h后,取增菌液样本在血琼脂平板培养基上用菌环划分分离线,然后倒置放立于含有CO₂和O₂的37℃恒温箱中孵化48 h。最后通过观察菌落在固体培养基上的生长形式、外形和聚落的大小,以及对菌落进行革兰氏染色判定有无污染。

1.3 装置瓶装载的自体血清对临床干眼的疗效评估

1.3.1 自体血清使用方法 本实验自体血清开启后,装置瓶组使用期限为14 d,普通瓶组使用期限为3 d。2组患者的治疗周期均为4周。每名参与者均取右眼为观察眼。滴眼液的用法均为每日4次,每次1滴,并在用药前和用药后2、4周进行临床干眼检测。

1.3.2 干眼疗效评估 所有参与者各时间点均按以下顺序进行检测:①填写OSDI评分问卷表;②裂隙灯显微镜眼前节检查;③BUT测定和CFS评分;④表现麻醉后的S I T。S I T结果作为本实验主要疗效指标。

BUT检测:结膜囊内滴1滴(1~2 μ l)荧光素钠后眨眼,裂隙灯下观测自最后1次瞬目后睁眼至角膜出现第1个黑斑的时间;CFS:采用12分法:将角膜分为4个象限,每个象限为0~3分,无染色为0分,1~30个点状着色为1分,>30个点状着色但染色未融合为2分,3分为出现角膜点状着色融合、丝状物及溃疡等;S I T:表面麻醉下,取1张5 mm×35 mm的滤纸(Whatman 41号滤纸),一端反折5 mm,另一端自然下垂,嘱患者轻轻闭眼,5 min后取下滤纸并测量泪液浸湿滤纸的长度。

1.4 统计学方法

前瞻性队列研究。本实验采用SPSS 17.0进行2组间比较,采用GraphPad StatMate进行样本量计算。S I T为正态分布资料,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,4周治疗时期内2组间疗效比较采用重复测量数据方差分析。OSDI、BUT、CFS经正态性检验为偏态分布,故采用中位数(四分位数间距)表示,4周治疗期间2组间疗效比较采用基于秩次的重复测量数据方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 普通瓶与装置瓶自体血清污染情况

30 瓶普通瓶中,第 3 天无污染情况出现,第 7 天有 2 瓶污染,第 14 天有 4 瓶污染,第 21 天有 12 瓶污染;而在 21 d 的观察期间内,30 瓶装置瓶均未出现污染情况。

2.2 普通瓶与装置瓶装载的自体血清治疗干眼疗效比较

如表 1 所示,2 组间在 4 周的治疗过程中,SIT、BUT、CFS、OSDI 各参数差异均无统计学意义。

3 讨论

自体血清与正常泪液有着极其相似的成分。自体血清中含有诸如上皮生长因子、纤维连接蛋白、转化生长因子-β、维生素 A、球蛋白、白蛋白、补体等活性因子,这些成分在促进眼表上皮细胞的增殖、分化方面起到重要作用^[1]。自体血清还拥有与正常泪液非常相似的 pH 值、渗透压以及生化特性。大量研究证实,对于应用传统疗法不敏感的中重度干眼患者,自体血清能有效地改善疾病状况,包括:主观症状、泪膜稳定性、角膜屏障功能与结膜鳞状化生程度^[6-7]。自体血清已成为治疗中重度干眼的重要手段。

自体血清来自于自身体液,需个体化制备,为避免药物毒性,这些制剂通常不添加防腐剂,这就存在了潜在的污染风险。尽管污染可能发生在试剂制备的任何阶段,但主要还是发生在患者使用过程中。自体血清滴眼液易被眼部或眼周的细菌,如表皮葡萄球菌等所污染^[8-10]。普通瓶装载的自体血清与外界接触,特别是接触到患者的眼睑部分,因为其瓶口口径相对较大,未采用特殊滤过装置,细菌极易回流到瓶中并生长繁殖。Sauer 等^[8]发现装载于普通瓶的自体血清滴眼液,即使在相对比较洁净的医院环境中使用,7 d 后污染率也高达 7.5%。据报道装载于普通瓶的自体血清滴眼液在家使用 5 d 后污染率高达 30%^[9]。

本实验采用了一种已商品化的、无需添加防腐剂的特殊滴眼液装置瓶来装载自体血清。该装置可通过以下原理有效避免细菌污染:①压力平衡系统:液体流出,空气进入;②通过弹簧的张力实现滴孔处的密封保护,以防止液体倒吸及细菌进入;③通过有效孔径为 0.2 μm 的微孔滤膜对补偿进入装置的空气进行过滤除菌。本研究发现,30 瓶装置瓶装载的自体血清 3 周内均未出现细菌污染,说明该装置瓶可有效避免自体血清使用过程中的污染状况。

据报道,0.2 μm 的微孔滤膜虽可有效滤过细菌,但也可能阻止一些大分子生长因子,如:转化生长因子 β 的通过^[2]。本实验采用的 Aptar 装置瓶采用双通道路径,自体血清流出并不通过滤膜,液体单向、不可逆排出瓶外,吸入瓶内补充负压的空气通过 0.2 μm 的微孔滤膜除菌,因此理论上可以很好地保证自体血清的有效活性成分流出。

对于单包装 4℃保存自体血清使用期限,目前尚无定论,由于 4℃保存自体血清在使用过程中极易污染,因此临床中多推荐患者最多使用 3 d。本研究发现 Aptar 装置瓶装载的自体血清使用 3 周内均未出现细菌污染,因此本研究把单包装 Aptar 装置瓶装载的自体血清使用期限延长至 2 周,而对照组普通瓶装载的自体血清使用期限依然为 3 d。2 组干眼患者在治疗 4 周后不适症状与眼表损害均得到有效改善,且 2 组间 BUT、CFS、SIT、OSDI 各参数均无统计学差异,这就表明,Aptar 装置瓶在不影响临床疗效的情况下可有效地延长单包装自体血清使用期限,提高自体血清的利用率。对于这一现象,我们推测 Aptar 装置瓶装载的自体血清,4℃保存 2 周和保存 3 d 相比,其主要活性成分可能并未出现明显改变。Tsubota 等^[11]曾报道 20%浓度自体血清在 4℃条件下保存 1 个月,其表皮生长因子、转化生长因子、维生素 A 的浓度水平均未出现明显下降。对于 Aptar 装置瓶装载的自体血清 4℃保存 2 周与保存 3 d 时相比活性成分是否出现明显改变尚待进一步研究证实。

表 1 装置瓶组与普通瓶组自体血清治疗干眼疗效比较

时间	SIT(mm)		OSDI(分)		BUT(s)		CFS(分)	
	普通瓶	装置瓶	普通瓶	装置瓶	普通瓶	装置瓶	普通瓶	装置瓶
治疗前	3.67±1.21	3.30±1.02	32.4[13.8]	35.4[11.8]	2.00[1.25]	3.00[2.00]	4.0[2.0]	3.0[1.0]
治疗 2 周	4.67±0.76	4.83±0.83	22.0[14.8]	25.0[10.3]	4.00[1.50]	4.00[3.00]	3.0[1.0]	2.5[1.0]
治疗 4 周	7.10±0.08	7.47±0.86	13.0[14.2]	16.0[10.4]	6.00[1.00]	6.00[2.00]	2.0[1.0]	1.0[1.0]
F	1.43		0.03		3.20		1.74	
P	>0.05		>0.05		>0.05		>0.05	

注:SIT,Schirmer I 试验;OSDI,眼表疾病指数;BUT,泪膜破裂时间;CFS,角膜荧光染色。各时间点均为 30 眼

参考文献:

- [1] Shimmura S, Ueno R, Matsumoto Y, et al. Albumin as a tear supplement in the treatment of severe dry eye[J]. Br J Ophthalmol, 2003, 87(10):1279-1283.
- [2] Bradley JC, Simoni J, Bradley RH, et al. Time and temperature dependent stability of growth factor peptides in human autologous serum eye drops[J]. Cornea, 2009, 28(2):200-205.
- [3] Sitaramamma T, Shivaji S, Rao GN. Effect of storage on protein concentration of tear samples[J]. Curr Eye Res, 1998, 17(10): 1027-1035.
- [4] MacLennan S, Hartwig D, Geerling G. Experiences with a centralised national service for autologous serum eyedrops in England[J]. Ophthalmologie, 2008, 105(10):639-643.
- [5] Miller KL, Walt JG, Mink DR, et al. Minimal clinically important difference for the Ocular Surface Disease Index[J]. Arch Ophthalmol, 2010, 128(1):94-101.
- [6] Watson SL, Daniels JT, Geerling G, et al. Clinical trials of therapeutic ocular surface medium for moderate to severe dry eye[J]. Cornea, 2010, 29(11):1241-1246.
- [7] Yoon KC, Heo H, Im SK, et al. Comparison of autologous serum and umbilical cord serum eye drops for dry eye syndrome [J]. Am J Ophthalmol, 2007, 144(1):86-92.
- [8] Sauer R, Bluthner K, Seitz B. Sterility of non-preserved autologous serum drops for treatment of persistent corneal epithelial defects[J]. Ophthalmologie, 2004, 101(7):705-709.
- [9] Garcia Jimenez V, Veiga Villaverde B, Baamonde Arbaiza B, et al. The elaboration use and evaluation of eye-drops with autologous serum in corneal lesions[J]. Farm Hosp, 2003, 27(1): 21-25.
- [10] Lagnado R, King AJ, Donald F, et al. A protocol for low contamination risk of autologous serum drops in the management of ocular surface disorders[J]. Br J Ophthalmol, 2004, 88(4): 464-465.
- [11] Tsubota K, Goto E, Shimmura S, et al. Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application[J]. Ophthalmology, 1999, 106(10):1984-1989.

(收稿日期:2015-05-16)

(本文编辑:季魏红)

·读者·作者·编者·

本刊行业公知公认名词缩略语

缩写	中文全称	英文全拼
HSV	单纯疱疹病毒	herpes simplex virus
HSK	单纯疱疹病毒性角膜炎	herpes simplex keratitis
PKP	穿透性角膜移植术	penetrating keratoplasty
ALK	前板层角膜移植术	anterior lamellar keratoplasty
DLK	深板层角膜移植术	deep lamellar keratoplasty
PCO	晶状体后囊膜混浊	posterior capsular opacification
ICCE	白内障囊内摘除术	intracapsular cataract extraction
ECCE	白内障囊外摘除术	extracapsular cataract extraction
IOL	人工晶状体	intraocular lens
PACG	原发性闭角型青光眼	primary angle-closure glaucoma
POAG	原发性开角型青光眼	primary open angle glaucoma
IOP	眼内压	intraocular pressure
RPE	视网膜色素上皮	retinal pigment epithelium
CNV	脉络膜新生血管	choroidal neovascularization
FFA	眼底荧光素血管造影	fundus fluorescein angiography
ICGA	吲哚菁绿血管造影	indocyanine green angiography
CSC	中心性浆液性脉络膜视网膜病变	central serous chorioretinopathy
AMD	年龄相关性黄斑变性	age-related macular degeneration
ERG	视网膜电图	electroretinogram
VEP	视觉诱发电位	visual evoked potential
RGPCl	硬性透氧性角膜接触镜	rigid gas-permeable contact lens
PRK	屈光性角膜切削术	photorefractive keratectomy
LASIK	准分子激光原位角膜磨镶术	laser in situ keratomileusis
LASEK	准分子激光角膜上皮瓣下磨镶术	laser epithelial keratomileusis
SBK	前弹力层下角膜磨镶术	sub-Bowman's keratomileusis
SMILE	飞秒激光小切口透镜取出术	small incision lenticule extraction
CCT	中央角膜厚度	central corneal thickness
haze	角膜上皮混浊	haze
OCT	光学相干断层扫描	optical coherence tomography
UBM	超声生物显微镜	ultrasound biomicroscopy
BCVA	最佳矫正视力	best corrected visual acuity
UCVA	裸眼视力	uncorrected visual acuity