

• 综 述 •

肽核酸荧光原位杂交技术:1 种检测慢性伤口感染生物膜的新工具

何永贵[△]综述,王 沛 审校

(湖北省荆门市第一人民医院检验科 448000)

关键词:生物膜; 伤口感染; 肽核酸类; 原位杂交, 荧光**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2011.01.040**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2011)01-0085-02

在发达国家,慢性难愈合伤口感染在人群的发生率约为 1%~2%^[1]。大量文献报道认为,慢性难愈合伤口感染与细菌生物膜(bacterial biofilm, BBF)的形成相关^[2-3]。黏附于组织表面的 BBF,由约占 1/3 的微菌落和占 2/3 的细菌分泌的水化聚合基质组成。存在于慢性伤口生物膜中的细菌可抵抗吞噬细胞的吞噬作用及抗生素的杀灭作用^[4]。为阐明细菌生物膜与慢性难愈合伤口之间的相互关系,许多诊断技术(如光镜检查技术、电子显微镜技术、荧光显微镜技术)及靶细胞放大扩增的分子生物学技术(如 PCR)被广泛地应用于检测生物膜中的细菌。这些方法往往存在一定的缺陷,且不能显示细菌在生物膜中的立体分布情况。肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)探针荧光原位杂交技术具有良好的杂交特异性和杂交动力特性,在检测鉴定细菌的同时维持细菌固有的形态^[5]。配合共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscopy, CLSM)的使用, PNA FISH 技术能检测和鉴定慢性伤口生物膜中的细菌种类及立体分布情况,具有较传统微生物检验技术无法比拟的优势^[6]。

1 PNA 荧光原位杂交的原理

肽核酸具有类似于肽链的骨架结构并携带有碱基, PNA 分子主链的骨架是由重复氮(2-氨基乙基)甘氨酸通过酰胺键连接组成,核酸碱基是通过亚甲基羰基连接在碳原子上,它能与 DNA 和 RNA 特异性地结合从而可制备 PNA 探针。PNA 探针不带电荷,具有极好的生物稳定性,这有助于提高其特异性、亲和力及活动性^[7]。PNA 探针比 DNA 探针有更高的疏水性,使其较易穿透疏水性的细胞壁而进入靶细胞的内部。PNA 探针的靶序列为细菌 16S rRNA 序列或真菌的 18S rRNA 序列,生长中的细菌或真菌细胞内部含有高丰度的核糖体 RNA 靶序列,其靶序列中含高度保守的具有种属特异性的 DNA 序列,是 PNA 探针理想检测对象。典型的 PNA 荧光原位杂交通常包括 3 个步骤:固定、杂交和洗涤。杂交结果以荧光显微镜观察,整个分析过程可在 1.5~2.5 h 内完成。PNA 探针可在低盐浓度下进行杂交,可大大提高细菌检测的效率和灵敏度。PNA 探针荧光原位杂交技术操作简单,类似于革兰染色或抗酸染色技术,故也被称之为快速诊断感染性疾病的智能染色技术^[8]。

2 细菌生物膜形成与慢性伤口感染不愈的关系

BBF 是 1 种附着于无活力的或活组织表面的、由其自身产生的聚合基质包裹的有结构的菌细胞群体。其基本结构由蘑菇样或柱样亚单位组成,亚单位可分为根部、茎部、头部三部分,每个亚单位的骨架为胞外多糖或多糖纤维蛋白复合体纠缠在一起形成的实心细条,交错成网状,这种特殊结构稳定且不易破坏,使 BBF 的生存能力提高^[9]。慢性伤口难愈合是人们一直在探索的问题。最近,有关 BBF 在慢性伤口形成中的作用引起了人们较大的兴趣,并认为 BBF 可能是伤口难愈合的 1 个新机制。慢性伤口感染久治难愈或不愈,可能与以下因素有

关:(1)生物膜内的细菌对抗生素不敏感,具有极强的耐药性;(2)生物膜内的浮游菌脱落后,造成感染的反复发作;(3)生物膜产生的胞外多糖成分——藻酸盐,是 1 种抗原性极强的成分,可刺激机体的免疫系统产生变态反应而致伤口损伤,而这些抗体却不能渗透进入生物膜^[10]。

3 PNA 探针荧光原位杂交技术的检测与鉴定

人们认识到,传统的培养检测法不能很好地检测慢性伤口生物膜中细菌,于是建立了一些分子生物学方法用于慢性伤口生物膜中细菌的检测鉴定^[11]。Fazli 等^[12]采集了 22 例伤口慢性感染且疑似铜绿假单胞菌定植的患者标本,培养法检出的结果多是金黄色葡萄球菌,少量为铜绿假单胞菌。而 PNA 探针荧光原位杂交法检出的结果多为铜绿假单胞菌,少量为金黄色葡萄球菌,且可显示其在组织标本中的分布。这两种方法检出结果的差异,是由于慢性伤口感染中的细菌形成了生物膜,细菌不以浮游状态而是以微菌落存在,常规的培养方法难以检出。两种方法的结果差异说明了传统培养法与 PNA 探针荧光原位杂交法检测结果无很好的相关性,需尽快建立 1 种适宜于检测慢性伤口生物膜中细菌的新方法。Malic 等^[13]联合采用 PNA FISH 和 CLSM 探讨慢性伤口生物膜中细菌种类及立体分布情况。CLSM 提高了分辨率,显著改变了视野的深度和广度,并且 CLSM 所观察的标本无需脱水等特殊处理,最大程度地保持了观察对象的完整性,从而使结果更接近真实情况^[14]。研究发现,慢性伤口生物膜中细菌的常见种类为铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、链球菌及微球菌等。PNA 探针经验证明其特异性良好,实验发现铜绿假单胞菌是慢性伤口生物膜中的优势病原菌,这与 Fazli 等^[12]的报道一致。CLSM 清楚地显示了细菌在慢性伤口生物膜中的空间分布情况。这些结果说明 PNA FISH 技术是检测慢性伤口生物膜中的细菌载量和立体分布情况的有力工具。

过去 20 多年来,分子生物学技术的广泛应用使得人们可从临床标本中直接检测细菌。但大多数分子生物学方法(如 PCR)需首先提取 DNA 或 RNA,这无疑会破坏细菌的形态及细菌在标本中分布的立体结构。DNA 探针荧光原位杂交法对于革兰染色阳性球菌,杂交前也需对细菌用溶菌酶等对细胞壁进行处理,便于 DNA 探针穿透坚韧的细菌细胞壁。但对于结构更短的 PNA 探针而言,通常情况下是无需对细胞壁预处理的。具体应用到慢性伤口生物膜中的细菌检测时,因生物膜较厚的黏性胞外基质将细菌包裹,使 PNA 探针的穿透作用减弱,杂交前依然还需使用酶处理以提高杂交效果。

4 PNA FISH 技术快速检测对患者管理的影响

生物膜大大提高了细菌的致病力,它可抵抗来自机体免疫力的杀灭作用和抗生素的攻击。了解慢性伤口生物膜中细菌种类、分布和数量是对慢性伤口进行管理的基本信息。据报道,在临床治疗和细菌检验中应区分有无细菌生物膜生长,对

[△] 通讯作者, E-mail:19840001@163.com。

有生物膜生长的细菌应联合使用抗生素,因感染了细菌并形成生物膜的组织即使扩大抗生素剂量多倍也难以治愈^[15]。在传统检测方法力所不及的情况下,PNA FISH 技术可弥补其不足。联合采用 PNA FISH 和 CLSM 无论对理论研究还是常规微生物检测,均是 1 种大有潜力的诊断工具。这种工具可用于快速检测慢性伤口生物膜中细菌,也可用于评价慢性伤口抗生素治疗后的效果评估。

5 存在的问题与展望

长期以来,大量的研究放在浮游细菌上,却忽视了作为细胞群体存在的细菌生物膜研究。显然,以浮游细菌为检测对象建立起来的实验室检测方法已无法满足检测慢性伤口生物膜中细菌的需要。PNA FISH 技术作为 1 种准确、快速的检测技术,对实验室的设置条件要求不高。商品化的试剂盒可从公司购买(<http://www.advandx.com>)。若自行设计探针,也可从专业公司订购(<http://www.panagene.com>)。相对于 DNA 探针,PNA 探针的文献报道和数据库还不多,PNA FISH 技术真正应用于临床还需一段时间。而且,PNA FISH 技术不能检测细菌的耐药基因。如今,美国 AdvanDx 公司虽已推出了直接从标本中检测 *mecA* 基因和 *vanA/B* 等其他耐药基因的试剂盒,但这些试剂盒还仅限于阳性血培养中细菌的快速鉴定与耐药基因检测^[16-17]。在不久的将来,随着 PNA 探针荧光原位杂交技术的普及和更多探针的设计,PNA FISH 技术必将成为慢性伤口生物膜中细菌研究和检测的利器。

参考文献

- [1] Gottrup FA. Specialized wound-healing center concept: importance of a multidisciplinary department structure and surgical treatment facilities in the treatment of chronic wounds[J]. *Am J Surg*, 2004, 187(6): S38-43.
- [2] Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms[J]. *Clin Micro Biol Rev*, 2002, 15(9): 167-193.
- [3] Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis[J]. *Annu Rev Micro Biol*, 2003, 57(6): 677-701.
- [4] Edwards R, Harding KG. Bacteria and wound healing[J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2004, 17(11): 91-96.
- [5] 王沛. 肽核酸荧光原位杂交技术在临床微生物快速鉴定中的应用进展[J]. *中华检验医学杂志*, 2009, 32(7): 825-827.
- [6] Malic S, Hill KE, Hayes A, et al. Detection and identification of specific bacteria in wound biofilms using peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization(PNA FISH)[J]. *Microbiology*, 2009, 155(16): 2603-2611.
- [7] Hartmann H, Stender H, Schfer A, et al. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* in blood cultures by a combination of fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes and flow cytometry[J]. *Clin Microbiol*, 2005, 43(4): 4855-4857.
- [8] Stender H. PNA FISH: An intelligent stain for rapid diagnosis of infectious diseases[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2003, 3(11): 649-655.
- [9] 彭倩, 钱元恕. 细菌生物被膜及其相关感染的研究进展[J]. *中国抗感染化疗杂志*, 2004, 4(2): 126-128.
- [10] 李鸿雁, 夏前明. 细菌生物被膜与难治性呼吸道感染[J]. *中国抗感染化疗杂志*, 2004, 4(1): 190-192.
- [11] Davies CE, Wilson MJ, Hill KE, et al. Use of molecular techniques to study microbial diversity in the skin: chronic wounds reevaluated[J]. *Wound Repair Regen*, 2001, 9(7): 332-340.
- [12] Fazli M, Madsen KG, Pedersen J. Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds[J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(9): 2717-2722.
- [13] Malic S, Hill KE, Hayes A, et al. Detection and identification of specific bacteria in wound biofilms using peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization(PNA FISH)[J]. *Micro Biology*, 2009, 155(5): 2603-2611.
- [14] 尉华, 周学东. 牙菌斑生物膜研究方法的新进展[J]. *中华微生态学杂志*, 2003, 15(7): 375-376.
- [15] 石磊, 玛依拉·吐地, 张建中, 等. 慢性化脓性中耳炎细菌生物膜体外检测及耐药性研究[J]. *中华耳科杂志*, 2008, 6(1): 290-294.
- [16] Levi K, Towner KJ. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) in blood with the EVIGENE MRSA detection kit[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(9): 3890-3892.
- [17] Kilic A, Baysallar M, Bahar G, et al. Evaluation of the EVIGENE VRE detection kit for detection of *vanA* and *vanB* genes in vancomycin-resistant enterococci[J]. *J Med Microbiol*, 2005, 54(13): 347-350.