论著

文章编号:1000-5404(2013)12-1242-05

纳米板转导 HPV18 E7siRNA 对宫颈癌细胞增殖的抑制作用

熊 倬[1],董晓静[1],孙培文[1],张 莹[1],朱赟珊[2] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院妇产科[1];310009 杭州,浙江大学医学院附属第二医院妇科[2])

[摘要] **目的** 通过纳米板转导 HPV18 E7 siRNA 进入 HPV18 E7 宫颈癌转基因鼠皮肤组织,探讨纳米板转导 siRNA 的效率及转导的 siRNA 对宫颈癌细胞增殖的抑制作用。**方法** 纳米板转导 FITC 标记的寡聚 DNA(代替 siRNA)进入小鼠皮肤,观察荧光变化,判断 DNA 是否被转导进入皮肤细胞中;纳米板转导 DiI 标记脂质体与 siRNA 复合物进入小鼠皮肤,测定转导前后和残留在皮肤上的荧光强度,计算纳米板转导 siRNA 进入组织细胞的效率;纳米板转导 E7 siRNA 和脂质体的复合物于转基因鼠皮肤中后, BrDU 免疫组化检测 siE7 对宫颈癌细胞增殖的抑制作用。**结果** 纳米板转导寡聚 DNA 后绿色荧光逐渐分散变多,表明 DNA 已逐渐进入小鼠皮肤细胞中。纳米板转导 DiI 标记脂质体与 siRNA 进入小鼠皮肤后,通过荧光强度计算得出转染率为 50.23%。纳米板转导 E7 siRNA 进入 HPV18 E7 宫颈癌转基因鼠皮肤后,能有效抑制宫颈癌细胞增殖。**结论** 纳米板能高效的转导 siRNA 进入组织细胞,并且转导进入细胞的 siE7 能有效抑制宫颈癌细胞增殖。

[关键词] 宫颈癌;纳米板;RNA 干扰;人乳头状瘤病毒

[中图法分类号] R394-33;R730.23;R737.33 [文献标志码] A

Nanopatch-delivered HPV18 E7 siRNA inhibits proliferation of skin cells in cervical cancer transgenic mice

Xiong Zhuo[1], Dong Xiaojing[1], Sun Peiwen[1], Zhang Ying[2], Zhu Yunshan[2] ([1]Department of Gynecology and Obstetrics, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]Department of Gynecology, Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou, Zhejiang Province, 310009, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the efficiency of siRNA delivery by using nanopatch and the inhibitory effect of HPV18 E7 siRNA (siE7) on the proliferation of skin cells in cervical cancer transgenic mice. **Methods** The oligonucleotide tagged with FITC as a substitute of siRNA was delivered into mouse skin by nanopatch, and the green fluorescence was observed to analyze whether the nanopatch can deliver siRNA into the cells of mouse skin. Nanopatch was used to deliver the complexes of siE7 and liposomes marked with DiI into mouse skin. The fluorescence intensity of DiI before and after transfection and that remained on the surface of mouse skin after transfection were determined. The efficiency of siE7 delivery by nanopatch was calculated, and BrdU immunohistochemistry was applied to detect the proliferation of skin cells transfected with siE7 in cervical cancer transgenic mice. **Results** The green fluorescence detected by confocal laser scanning microscopy (CLSM) after transfection by nanopatch increased and scattered, suggesting the oligonucleotide was delivered into skin cells. The transfection efficiency of using nanopatch to deliver siRNA was 50.23%. The proliferation of transgenic mouse skin cells transfected with siE7 by nanopatch was inhibited. **Conclusion** Nanopatch can effectively deliver siRNA into mouse skin cells, and siE7 delivered by nanopatch can inhibit the proliferation of skin cells of cervical cancer transgenic mice.

[**Key words**] cervical cancer; nanopatch; RNA interference; human papillomavirus

Supported by the Project of Medical Scientific Research of Chongqing Health Bureau(2010-2-162), the Project of Sci & Tech Research Chongqing Committee of Education (KJ110310), the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5071), and the Project of Scientif Research of Zheijiang Provincial Department of Health (Y201017552), Corresponding author: Dong Xiaojing, E-mail: xffdoctor@163.com

[基金项目] 重庆市卫生局医学科研计划(2010-2-162);重庆市教委科学技术研究项目(KJ110310);重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5071);浙江省教育厅科研项目(Y201017552)

[通信作者] 董晓静,E-mail:xffdoctor@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130131.1709.016.html(2013-01-31)

宫颈癌是危及妇女健康仅次于乳腺癌的第二大恶性肿瘤,HPV 的感染是宫颈癌的必要因素,高危型 HPV(HPV16 和 HPV18)的感染是引起宫颈癌和宫颈上皮内瘤变得主要因素。HPV 基因整合人类染色体后,早期转录期 E6、E7 原癌蛋白在细胞周期调控和凋亡调节中起重要作用,是宫颈癌发生、发展的主要原因。而此原癌蛋白与人体自身基因无同源性,因此成为宫颈癌生物治疗的主要靶标。众研究证明,特异性靶向于 E6、E7 的 RNA 干扰技术能有效地抑制 E6、E7 蛋白表达,并抑制肿瘤细胞的增殖[1-3]。

但是,如何将制备好的化学合成 siRNA 或者 shRNA 表达载体高效导入肿瘤细胞及肿瘤动物模型是 RNA 干扰技术的关键点。纳米板是一种主要成分为钨材料的,含有 10^4 个纳米针的小板。目前的研究表明其可以将大分子蛋白质及 DNA 导入细胞中而发挥作用[4-5],但少见其将小分子 siRNA 导入组织中的报道。本实验拟研究纳米板是否能将 siRNA 转导进入肿瘤组织细胞,转导进入的 siRNA 对肿瘤细胞增殖的抑制作用及转导效率。

1 材料与方法

1.1 材料

纳米板、HPV18 E7 宫颈癌转基因鼠(共 6 只,雌性,体质量 18 ~ 22 g)、siRNA、siE7(靶向于 HPV18 E7 mRNA 的 siRNA)、寡聚 DNA、阳离子脂质体等均由澳大利亚戴蔓蒂娜研究所提供。

纳米板主要由钨分子材料组成,表面覆盖一薄层金(400 ~ 1 500 nm 厚度)。每个纳米板大约 5 mm × 5 mm,其中心 4 mm × 4 mm 的面积约含有 3 364 个纳米针。每个纳米针基底部直径 25 ~ 30 μm,每两个纳米针中心间距大约有 70 μm,针长 60 μm[6]。

1.2 方法

1.2.1 纳米板转导 siRNA 及脂质体于鼠皮肤组织的基本操作

于无菌无酶的 EP 管中加入 5 μL siRNA,取 1 μL 脂质体加入该管,混匀,室温孵育 10 ~ 15 min。再加入 5 μL 2% MC(甲基纤维素),混匀后滴加在纳米板上,用氮气吹至混合物成一薄膜。超净台里小鼠,铁架台固定纳米板装置,固定小鼠使纳米板正对小鼠耳朵,用 0.5 N 的重力迅速释放装置使纳米板的针头瞬间进入细胞释放 siRNA 与脂质体复合物,作用 10 min 后取下装置;每个部位重复 2 次。

1.2.2 验证纳米板能否转导 siRNA 进入小鼠皮肤组织 用 FITC 标记的寡聚 DNA 代替 siRNA,用纳米板将其导入小鼠耳朵皮肤中,对照组小鼠耳朵皮肤不做处理。分别在 0、24、48 h 后,切取小鼠耳朵,电子激光共聚焦显微镜观察转导后后荧光变化,验证纳米板是否可以将小分子 siRNA 转导进入在体皮肤细胞中。

1.2.3 计算纳米板转导 siRNA 的转导效率 DiI 标记脂质体,体外和 siRNA 形成复合物,用纳米板转导其进入小鼠耳朵皮肤,分别用荧光强度检测仪测定转导前、转导后和残留在皮肤上的 DiI 荧光强度,通过公式计算转导效率:转导效率 = (转导前荧光强度 - 转导后荧光强度 - 残留皮肤荧光强度)/转导前荧光强度。每次实验取 5 个样本,结果重复 3 次。

1.2.4 研究纳米板转导的 siE7 对宫颈癌细胞增殖的抑制作用

纳米板分别转导 siGFP(靶向于绿色荧光蛋白 mRNA 的 siRNA,阳性对照) + 脂质体、siE7 + 脂质体、空白对照、脂质体进入 HPV18 E7 宫颈癌转基因鼠一侧(右侧)耳朵皮肤中,对侧皮肤不做任何处理(两只转基因鼠 4 只耳朵随机分 4 组,实验重复 3 次;4 组分别为 siGFP 组、siE7 组、空白对照组及脂质体组,右侧皮肤为转导侧,左侧为未转导侧),48 h 后切取耳朵做 BrDU(5-Bromo-2-deoxyUridine,5-溴脱氧尿嘧啶核苷)免疫组化染色(卵白素-生物素-过氧化物酶复合物,SABC 法),计数各组皮肤两侧棕色颗粒数,分析 siE7 对宫颈癌细胞增殖的抑制作用。BrDU 是 DNA 前体胸腺嘧啶核苷类似物,能选择性的渗入到处于细胞周期 S 期(即 DNA 合成期)细胞的单链 DNA 核苷酸序列中,BrDU 标记的细胞即是增殖期细胞,因此 BrDU 免疫组化实验中被染色为棕色的细胞即是增殖细胞。

1.3 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用 SPSS 17.0 统计软件,多个样本均数比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 多电子激光共聚焦显微镜观察纳米板转导 siRNA后不同时间荧光变化

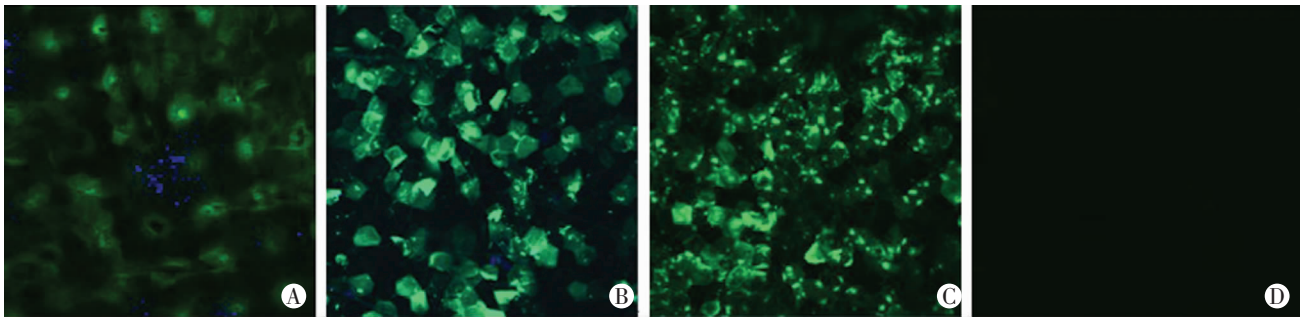
转导后即刻可见在皮肤中有绿色荧光;24 h 后,在皮肤中可见散在的绿色荧光;48 h 后,在皮肤中可见散在的绿色荧光增多;对照组为正常小鼠皮肤,未观察到荧光。散在荧光的逐渐增多证明 DNA 已经逐渐进入细胞内,从而说明纳米板能够将 siRNA 导入在体皮肤细胞中(图 1)。

2.2 纳米板转导 siRNA 的效率

3 次重复试验分别计算得出转导效率为 46.26%、48.31%、50.23%。其中,转导效率为 50.23% 时分别检测的荧光强度如下:转导前 Dil 总荧光强度 0.134,转到后荧光强度 0.066 7,残留于皮肤上的荧光强度为 0,通过公式计算得出转导率为 50.23%。

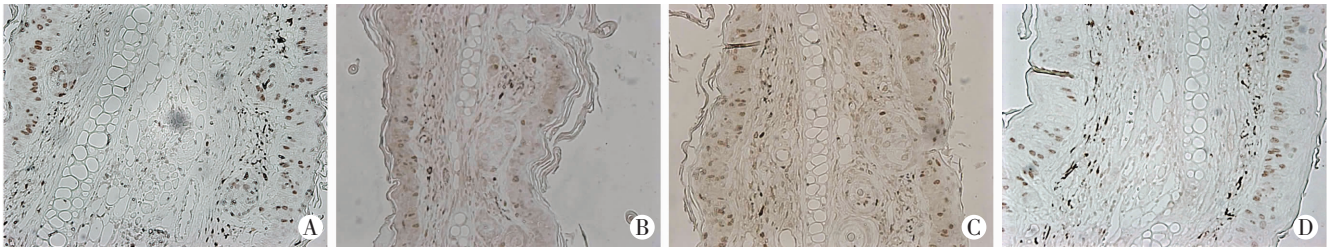
2.3 转基因鼠耳朵皮肤组织 BrDU 免疫组化染色

结果见图 2、3。BrDU 免疫组化结果显示 siE7 组纳米板转导侧棕色颗粒明显少于未转导侧,差异有统计学意义($P < 0.01$),其余各组皮肤两侧棕色颗粒无明显差异,siE7 组转导侧相对于其他各组转导侧棕色颗粒明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。由此推论:纳米板转导的 siE7 可以有效地抑制宫颈癌细胞的增殖。



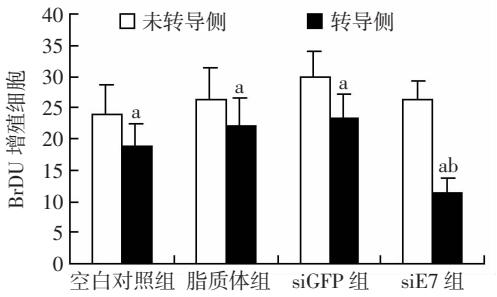
A:0 h; B: 24 h;C:48 h;D: 空白对照

图1 纳米板转导 FITC 标记的寡聚 DNA 后不同时间段荧光变化 （多电子激光共聚焦显微镜 ×200）



A: siGFP 组; B: siE7 组; C: 空白对照组; D: 脂质体组

图2 BrDU 免疫组化观察各组宫颈癌细胞增殖情况 （SABC ×200）



a: $P<0.05$,与 siET 组比较;b: $P<0.01$,与未转导侧比较

图3 各组转导侧与未转导侧宫颈癌细胞增殖的变化

3 讨论

宫颈癌是妇女常见的恶性肿瘤之一,仅次于乳腺癌居于第二位[7]。早期宫颈癌放疗及化疗的效果好,而晚期则失去手术机会,放化疗等综合治疗后转移及复发率仍高,因此需要新的治疗手段来弥补目前治疗的不足。

研究表明,99% 的宫颈癌组织中可检出人乳头状瘤病毒(human papillomavirus,HPV)[8]。其中,高危型 HPV 病毒(HPV16 和 HPV18)基因组整合人类染色体后,早期转录区 E6、E7 基因的表达产物 E6、E7 原癌蛋白在细胞周期调控及凋亡调节中起重要作用,是宫颈癌发生、发展的主要原因[9]。因该基因与人体自身基因无同源性,从而成为宫颈癌生物治疗的主要靶标。目前基于 HPV 抗宫颈癌的策略有 2 种:基于 HPV 的肿瘤疫苗研究和干扰 HPV 致癌环节的研究[10]。预防性 HPV 疫苗已取得了很大的进展,但治疗性疫苗仍未能取得重大突破[11]。因此进行阻断 HPV 致癌环节的研究具有重要意义。

RNA 干扰技术(RNAi)是双链 RNA (siRNA)分子诱导细胞内与其序列同源的基因 mRNA 降解而引起的转录后基因沉默现象。RNA 干扰技术具有反义核酸和核酶技术所无可比拟的高效率、高特异性、显效快、可以向子代遗传和可同时进行多基因研究等优点[12],为致病基因表达的沉默提供了新的手段。运用靶向于 HPV16/18 E6/E7 mRNA 的 RNA 干扰技术阻断 HPV 致癌环节,作为抑制宫颈癌细胞增殖的手段,已被众多的研究者验证。但是,如何高效地转导 siRNA 及 shRNA 表达载体进入宫颈肿瘤,该问题使得干扰技术进入临床应用处于“瓶颈”阶段,是该技术成熟的关键。

对于动物实验,目前主要是将化学合成 siRNA 或 shRNA 表达载体包裹在转染试剂中或者利用慢病毒载体,再通过各种转导途径导入体内[13-16],包括尾静脉注射、腹腔注射、局部瘤内注射、瘤旁注射等,siRNA 需经过体内多重屏障,并受血液等多种成分影响,到达局部瘤体后分散吸收效果差,最后到达瘤体内部发挥有效作用的成分相当有限而不足以抑制癌细胞的生长,并且安全性低,用量大,费用贵。所以急需寻求一种安全有效转导 siRNA 或 shRNA 表达载体进入肿瘤内的方法。

基于以上理论,本课题引入纳米板来转导 siRNA,纳米板是一种高通量、瘤体局部微量注射的方法。根据纳米板作用原理,纳米板有非常多的纳米级的针孔,能够高效、准确地将 siRNA 导入瘤体局部;纳米板可

直接穿透细胞膜,使得 siRNA 可以直接充分通过针孔导入细胞质而发挥作用,并且因纳米板不进入细胞核而对细胞的损害性很小;纳米板转导 siRNA 是利用氮气制成含有 siRNA 的甲基纤维素膜,在干燥的状态下进行转导的,使得 siRNA 在室温时非常稳定[6]。总而言之,纳米板的最大优势就是可以集中有效转导 siRNA,对组织细胞的损害非常小,通过氮气(作用时与纳米板成20°角,此时的力度及角度使得形成的膜中 siRNA 更集中更充分的进入细胞)不但能够将 siRNA 均匀分布于各针孔从而导入细胞,剩余分布于纳米针之间的 siRNA 将通过转染作用进入细胞,从而增加转导率,更重要的是,在干燥状态下转导 siRNA 时其足够稳定,因为高效、准确、直接的转导方式使得 siRNA 的用量相比较传统方式少很多。

本课题通过三个部分来证明纳米板能够转导 siRNA 以及转导 siRNA 的高效性。首先,运用纳米板转导荧光标记的 siRNA,多电子激光共聚焦观察到荧光逐渐进入细胞当中,从而证明纳米板是可以转导 siRNA 进入组织细胞的;其次,通过检测纳米板转导前后及残留在皮肤上的 Dil 强度,计算得出纳米板转导 siRNA 的转导效率可达 50.23%;最后,BrDU 免疫组化染色检测纳米板转导特异性 siE7 后宫颈癌细胞的增值活性,实验结果证明,纳米板转导 siRNA 后可有效抑制宫颈癌细胞增殖。

我们的实验已经证明,纳米板的确可以转导 siRNA进入组织细胞,并有效抑制宫颈癌细胞的增殖;相比较传统转导 siRNA 的方式,纳米板的众多优点使得其转导效率高,安全性好。

纳米板是一种主要由钨分子材料组成的小板,每平方厘米上设置有 10^4 个纳米针,其针尖宽度只有纳米级。目前的研究表明其可以将大分子蛋白质及 DNA 导入细胞中而发挥作用,但尚无其将小分子 siRNA 导入组织中的报道。与大分子蛋白质及 DNA 相比,siRNA 存在分子量更小,靶向性更特异等特点,理论上更容易被纳米板转导进入组织细胞。由于纳米板针尖只有纳米级,因此其具有直接穿透细胞膜,将其携带的 siRNA 导入细胞内的作用,有别于普通注射用针,并将对组织损伤降到了最低。与常规机械法中的显微注射相比,由于每块板上具有很多针,其具有更高效、简便的特点,克服了显微注射的缺点;与基因枪相比,其转导的 siRNA 不进入细胞核,而不损伤细胞,具有更高的安全性。

目前所有的 siRNA 转染方法都只能通过普通注射的方法将 siRNA 导入在体组织中,不论尾静脉注射或者局部的瘤内注射,siRNA 在肿瘤组织中的吸收扩散是影响其发挥作用的重要因素之一。基于纳米板的作用原理,纳米板直接将 siRNA 导入瘤体局部,不通过体内的血液成分及多种屏障;并且其大量纳米级的针尖可以均匀的将 siRNA 分散转导进入组织细胞中,不集中于一点,从而大大提高了 siRNA 的有效利用。在我们的试验中,为了克服纳米板进入组织的“毛细现象”,针间距必须保持一定的距离,而这又会影响转导 siRNA 进入组织的量。因此,我们把各种体外培养细胞的 RNA 干扰实验中应用最多的阳离子脂质体与 siRNA 结合,然后通过纳米板转导进入组织中,这样一来,不但针尖内的 siRNA 可以直接进入组织细胞,针尖之间的 siRNA 也可以通过脂质体转染进入组织细胞,增加纳米板的转导效率,更重要的是,脂质体同时可以延缓 siRNA 很快被体内的相关成分降解,继而延长 RNA 干扰的作用时间。

综上所述,纳米板作为一种新型的纳米级材料,转导 siRNA 时无需受血液等成分影响,直接到达瘤体局部,且能够均匀分散进入瘤体组织细胞,用量小,安全性高,弥补了传统转导方法众多不足,为干扰技术进入临床应用提供了美好前景,给人类宫颈癌的治疗带来了新的希望。但是,纳米板转导 siRNA 的应用仅仅只是个开头,在其能真正进入临床应用前,我们还需要做很多工作。我们拟在后期的实验中,具体分析比较传统的注射方法与纳米板转导 siRNA 的效率,进一步验证纳米板的优越性;并通过 mRNA 水平、蛋白水平及细胞水平进一步验证纳米板转导 siE7 后对宫颈癌细胞增殖的抑制作用;以及使用纳米板的安全性等问题。总之,运用纳米板转导 siRNA 进入肿瘤组织细胞,是将 RNA 干扰技术引入宫颈癌生物治疗的一个突破,随着其进一步的深入研究,相信其将为宫颈癌患者带来福音。

参考文献:

[1] Yoshinouchi M, Yamada T, Kizaki M, *et al*. *In vitro* and *in vivo* growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by E6 siRNA[J]. Mol Ther, 2003, 8(5): 762-768.

[2] Chang J T, Kuo T F, Chen Y J, *et al*. Highly potent and specific siRNAs against E6 or E7 genes of HPV16- or HPV18-infected cervical cancers[J]. Cancer Gene Ther, 2010, 17(12): 827-836.

[3] GuW, Putral L, Hengst K, *et al*. Inhibition of cervical cancer cell growth *in vitro* and *in vivo* with lentiviral-vector delivered short hairpin RNA targeting human papillomavirus E6 and E7 oncogenes[J]. Cancer Gene Ther, 2006, 13(11): 1023-1032.

[4] Kendall M A, Chong Y F, Cock A. The mechanical properties of the skin epidermis in relation to targeted gene and drug delivery[J]. Biomaterials, 2007, 28(33): 4968-4977.

[5] Kendall M. Engineering of needle-free physical methods to target epidermal cells for DNA vaccination[J]. Vaccine, 2006, 24(21): 4651-4656.

[6] Chen X, Prow T W, Crichton M L, *et al*. Dry-coated microprojection

array patches for targeted delivery of immunotherapeutics to the skin [J]. J Control Release, 2009, 139(3): 212 – 220.
[7] Roden R B, Gravitt P, Wu T C. Towards global prevention of human papillomavirus-induced cancer[J]. Eur J Immunol, 2008, 38(2): 323 – 326.
[8] Andersson S, Rylander E, Larsson B, *et al*. The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis[J]. Eur J Cancer, 2001, 37(2): 246 – 250.
[9] Munoz N, Bosch F X, de-Sanjose S, *et al*. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer[J]. N Engl J Med, 2003, 348(6): 518 – 527.
[10] Brantl S. Antisense-RNA regulation and RNA interference [J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1575(1/3): 15 – 25.
[11] Anderson S M. Human papillomavirus and cervical cancer[J]. Clin Microbiol Newslett, 2002, 24(15): 113 – 118.
[12] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, *et al*. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. Nature, 2001, 411(6836): 494 – 498.
[13] 张晓静, 葛银林, 侯琳, 等. KDR 为靶的 siRNA 抑制乳腺癌细胞增殖的体内外研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24(1): 58 – 61.
[14] Wang J, Liu K, Shen L, *et al*. Small interfering RNA to c-myc inhibits vein graft restenosis in a rat vein graft model[J]. J Surg Res, 2011, 169(1): e85 – e91.
[15] Giladi H, Ketzinel-Gilad M, Rivkin L, *et al*. Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice [J]. Mol Ther, 2003, 8(5): 769 – 776.
[16] Fujii T, Saito M, Iwasaki E, *et al*. Intratumor injection of small interfering RNA-targeting human papillomavirus 18 E6 and E7 successfully inhibits the growth of cervical cancer[J]. Int J Oncol, 2006, 29(3): 541 – 548.

(**收稿**:2012-10-25;**修回**:2012-11-28)
(编辑 吴培红)

经验交流

文章编号:1000-5404(2013)12-1246-01

某基层医院呼吸内科多重耐药菌目标性监测效果分析

何 健[1],赖富华[2],曾荣芳[3] (400062 重庆,重庆市第五人民医院医院:感染管理科[1],呼吸内科[2];400064 重庆,重庆工商大学卫生科[3])

[**关键词**] 多重耐药菌株;目标性监测;危险因素;隔离措施
[**中图法分类号**] R639.01 [**文献标志码**] B

多重耐药菌是临床难题和公共卫生威胁,多重耐药菌防控是当今感染控制工作最大的挑战之一[1]。2010年1至2012年9月对某基层三乙医院呼吸内科所有住院患者病原微生物检测出多重耐药菌者进行了目标性监测[2]。该科有50张编制病床,2012年床位占用率为155.47%,呼吸内科近年多重耐药菌株检出数有增多趋势,是多重耐药菌管理的重点部门,为有效控制多重耐药菌的传播,合理使用抗菌药物,医院感染管理科对呼吸内科检出多重耐药菌株的患者隔离措施进行了目标性监测。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2010年1月至2012年9月呼吸内科所有住院患者病原微生物检测出多重耐药菌者,包括感染患者和定植患者[3]。

1.2 诊断标准

依照卫生部《多重耐药菌医院感染预防与控制技术指南(试行)》,多重耐药菌是指多重耐药菌(multidrug-resistant organism, MDRO),主要是指对临床使用的三类或三类以上抗菌药物同时呈现耐药的细菌。送检标本采用法国生物梅里埃细菌鉴定仪VITEK2 Compact鉴定。

1.3 干预措施

1.3.1 按危急值报告临床科室和院感管理科 检验科微生物室检出多重耐药菌株后按危急值要求电话通知呼吸科和医院感染管理科,医院感染管理科接到报告后进行登记。

1.3.2 现场干预 医院感染科于当天或隔日到科室对其所采取的措施进行首次检查,检查内容包括:①医生是否开具"接触隔离"长期医嘱;②是否进行单间隔离或床旁隔离[3-4];③床尾和病历夹上是否贴出"接触隔离"标识;④床旁是否配置手套、速干手消毒剂、必要时备隔离衣;⑤患者周边环境每日清洁消毒及记录;⑥医务人员手卫生依从性[5]。

1.3.3 后续跟踪检查。医院感染管理科不定期对该科的处置情况进行后续跟踪检查。

1.3.4 结束干预的标准 患者标本连续2次(间隔应>24 h)耐药菌培养阴性或感染已痊愈但无标本可送,方可解除隔离[6]。

2 结果

2.1 多重耐药菌检出结果

2010–2012年呼吸内科送检患者中128例患者检出多重耐药菌株143株,其中,同一次住院期间检出2种多重耐药菌株的有15例次。送检标本包括痰标本120份、血液8份、尿液7份、呼吸道灌洗液6份、脑脊液和腹水各1份。多重耐药检出结果见表1。

(下转1256页)

[**通信作者**] 赖富华,E-mail:wuyuanlaifh@163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130516.1138.016.html(2013-05-16)