

文章编号: 1001-8689(2019)06-0736-05

肉芽肿性乳腺炎的病原菌分布及药敏分析

唐玲玲 刘成义 纪存委 刁福强 赖卫明 穆小萍*
(广东省妇幼保健院, 广州 511400)

摘要: **目的** 分析广东省妇幼保健院肉芽肿性乳腺炎病原菌分布特点及主要细菌的药物敏感情况, 为肉芽肿性乳腺炎的病因和治疗提供依据。**方法** 收集肉芽肿性乳腺炎患者的脓液标本, 培养后进行分离、鉴定, 对分离的主要细菌使用药敏卡或微量肉汤稀释法进行药敏试验, 分析细菌的分布及药物的敏感率。**结果** 436 例肉芽肿性乳腺炎患者中细菌培养阳性 111 例, 培养阳性率为 25.45%, 细菌分布以棒状杆菌为主, 分离率达 70.27%(78/111), 其中以微小棒状杆菌和 G 群棒状杆菌为主 (48/78), 棒状杆菌对青霉素、亚胺培南、美罗培南、克林霉素敏感率较低 (<55%), 对庆大霉素、利奈唑胺、万古霉素、利福平有较高敏感率 (>90%)。**结论** 棒状杆菌感染与肉芽肿性乳腺炎具有密切关系, 伴有棒状杆菌感染的肉芽肿性乳腺炎可用万古霉素、利奈唑胺、庆大霉素等敏感性较高的药物进行辅助治疗。

关键词: 肉芽肿性乳腺炎; 棒状杆菌; 病原菌; 药敏试验

中图分类号: R978.1 **文献标志码:** A

Distribution and drug sensitivity of pathogenic bacteria in granulomatous mastitis

Tang Ling-ling, Liu Cheng-yi, Ji Cun-wei, Diao Fu-qiang, Lai Wei-ming and Mu Xiao-ping
(Guangdong Provincial Maternal and Child Health Hospital, Guangzhou 511400)

Abstract Objective To analyze the distribution characteristics and main bacteria drug susceptibility of granulomatous mastitis in Guangdong Provincial Maternal and Child Health Hospital to help explore the prevention and treatment strategies of breast infections. **Methods** The pus samples of patients with granulomatous mastitis were collected, separated, and identified after culture. Drug sensitivity test of the main strains was performed using the drug sensitivity card or the microbroth dilution method to analyze the distribution of bacteria and the sensitivity of drugs. **Results** Among 436 patients with granulomatous mastitis, 111 were positive for bacterial culture (25.45%). the distribution was mainly *Corynebacterium*, the isolation rate was 70.27% (111/436), and *Corynebacterium minutissimum* and G group *Corynebacterium* were the main ones (48/78). *Corynebacterium* has a low sensitivity rate to penicillin, imipenem, meropenem, and clindamycin (<55%), and has a high sensitivity rate to gentamicin, linezolid, vancomycin, and rifampin. **Conclusion** *Corynebacterium* infections are closely related to granulomatous mastitis. The granulomatous mastitis with *Corynebacterium* infections can be treated with highly sensitive drugs such as gentamicin, linezolid, and vancomycin.

Key words Granulomatous mastitis; *Corynebacterium*; Pathogenic bacteria; Drug sensitivity test

收稿日期: 2018-08-20

作者简介: 唐玲玲, 女, 生于 1986 年, 硕士, 主管技师, 主要从事微生物学检验与研究工作, E-mail: 370018529@qq.com

* 通讯作者, E-mail: mxp721@sina.com

乳腺炎作为女性常见病,按病因不同可分为急性化脓性乳腺炎、肉芽肿性乳腺炎、浆细胞性乳腺炎等。其中急性化脓性乳腺炎和肉芽肿性乳腺炎与细菌感染关系较为密切。女性乳腺结构复杂,具有多种腺体及内容物,故而不同类型乳腺炎的病原菌分布具有多样性。肉芽肿性乳腺炎是一类多在非哺乳期以肉芽肿为主要病理特征乳腺慢性炎症,以小叶性多见,可继发溃疡、窦道,易复发且难愈合,确诊主要依赖病理活检。肉芽肿性乳腺炎较少见,但近年发病率有增加趋势^[1]。近年有研究表明肉芽肿性乳腺炎与棒状杆菌感染关系密切,以 Taylor 等^[2]的研究证据最为充分,但文献报道数量较少且细菌分布结果有较大差异。有些实验室对棒状杆菌采用纸片扩散法(KB法)进行药敏试验,而美国临床和实验室标准协会(CLSI)执行的抗微生物药物敏感性试验标准并无棒状杆菌纸片扩散法药敏标准^[3],并且适合临床应用的最低抑菌浓度(MIC)药敏方法较少,给临床抗生素治疗造成影响。本研究旨在分析肉芽肿性乳腺炎的细菌分布及药物敏感性结果,为疾病机制探讨及临床治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 一般资料

标本收集于2016年1月—2017年12月我院乳腺防治中心收治根据病理结果确诊的肉芽肿性乳腺炎患者共436例,以进行细菌鉴定及药物敏感试验。收集棒状杆菌共30株,根据CLSI标准采用微量肉汤稀释法进行棒状杆菌药敏试验。用无菌方式采集乳腺脓液,标本的采集和培养严格按《临床检验操作规程》的相关要求进行。

1.2 仪器与试剂

Lecia DM1000 光学显微镜, HF90/HF240 二氧化碳培养箱, 荷兰 Anoxomat MARK II 全自动厌氧/微需氧培养系统, ESCO AB2-6S1 外排式生物安全柜。哥伦比亚血琼脂培养基(广州迪景), 巧克力血琼脂培养基(郑州安图), 念珠菌显色平板(广州迪景), 阳离子调节 MH 肉汤(上海瑞楚), 革兰快速染色液(珠海贝索)。VITEK 2 全自动微生物鉴定及药敏分析系统(Biomérieux)、与其配套的 GP、GN 鉴定卡, RapID™ CB PLUS 棒状杆菌鉴定板条, 一次性微量聚乙烯 96 孔培养板(Jet Biofil), 青霉素、万古霉素、亚胺培南、美罗培南、庆大霉素、克林霉素、利奈唑胺、利福平标准品(中国食品药品检定研究院)。

1.3 方法

1.3.1 接种与培养

将合格的脓液标本采用平板划线法分别接种于哥伦比亚血琼脂平板、巧克力平板, 真菌接种于真菌显色平板, 厌氧或微需氧菌培养使用厌氧/微需氧培养系统。需氧菌接种后在 35℃ 恒温的 5% CO₂ 培养箱倒置培养 1~2d, 若为菌落细小、生长缓慢的革兰阳性细菌则适当延长培养时间至 5d 防止漏检。

1.3.2 病原菌鉴定

培养阳性标本先进行涂片制备及革兰染色, 根据镜下形态进行初步鉴定。常规细菌使用 VITEK 2 全自动微生物鉴定仪及配套 GP、GN 卡进行鉴定; 棒状杆菌使用 RapID™ CB PLUS 鉴定板条进行鉴定; 真菌按照其显色平板的不同颜色进行鉴定。

1.3.3 棒状杆菌药敏试验

棒状杆菌药敏试验及结果判读均根据 CLSI M45-A3 标准采用微量肉汤稀释法进行。参照 CLSI M45-A3 标准结合临床常用药物选择青霉素、万古霉素、亚胺培南、美罗培南、庆大霉素、克林霉素、利奈唑胺、利福平共 8 种药物做药敏试验。先对抗菌药物粉末进行溶解、稀释, 连续倍比稀释成 256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25 和 0.125 μg/mL 共 12 个浓度。将培养好的棒状杆菌与琼脂混合成 1.5×10^8 CFU/mL, 待转移至微量聚乙烯 96 孔板。在微量聚乙烯 96 孔板中加入不同浓度抗生素与稀释好的琼脂菌液, 同时设阴性对照和空白对照。在 35℃ 空气环境下培养 24h 后记录结果, 培养过程中使用带盖湿盒防止液体挥发, 培养箱定期灭菌以防止受霉菌污染。

1.3.4 药敏试验的质量控制

每批棒状杆菌药敏试验均设质控, 质控菌株药敏结果在允许范围内判为本次试验有效。根据 CLSI M45-A3 标准, 青霉素、万古霉素、亚胺培南、美罗培南、克林霉素、利奈唑胺、利福平用肺炎链球菌 ATCC49619 作为质控菌株, 庆大霉素用大肠埃希菌 ATCC25922 作为质控菌株。

2 结果

2.1 我院肉芽肿性乳腺炎就诊率统计

2016 年 1 月—2017 年 12 月于本院乳腺病防治中心就诊的肉芽肿性乳腺炎共 505 例, 占就诊乳腺炎患者的 3.88%(505/13011)。年龄 19~49 岁, 其中 21~30 岁分布最多, 占 360 例。

2.2 病原菌鉴定结果

2.2.1 形态特点

培养阳性标本经分离后，观察菌落形态特点并取纯菌落进行镜下形态观察(图 1~2)。慢性肉芽肿性乳腺炎则以细小、光滑、凸起的灰白圆形菌落较多，其镜下形态为革兰染色阳性直或微弯曲杆菌，纵边不平行，常有异染颗粒和末端膨大，常成对并排、V 形、簇状排列。观察菌落与镜下形态特点可进行大致分类，继而选择 VITEK 鉴定卡、RapID™ CB PLUS 鉴定板条或其他生化鉴定试验等方法鉴定到种。

2.2.2 肉芽肿性乳腺炎病原菌分布

在 436 例肉芽肿性乳腺炎患者送检标本中，有 111 例细菌培养阳性，总培养阳性率为 25.45%。111 例培养阳性标本经鉴定以棒杆菌属为主，棒状杆菌阳性率为 70.27%(表 1)。

2.2.3 肉芽肿性乳腺炎中分离的棒状杆菌类型分布 (板条鉴定法)

肉芽肿性乳腺炎中分离的 78 株棒状杆菌属经 RapID™ CB PLUS 板条鉴定，以微小棒状杆菌和 G 群棒状杆菌为主，棒状杆菌属中构成比为 61.5%，总阳性标本中构成比为 43.23%(表 2)。

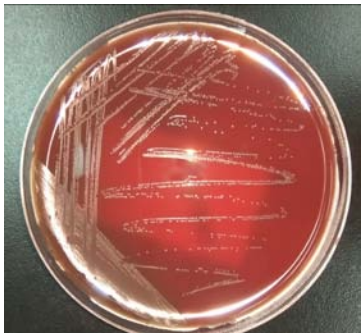


图 1 棒状杆菌菌落形态 (血平板)
Fig. 1 Morphology of *Corynebacterium*

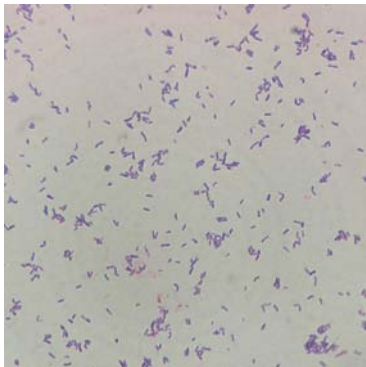


图 2 棒状杆菌镜下形态 (革兰染色, ×1000)
Fig. 2 Microscope morphology of *Corynebacterium* (Gram, ×1000)

表 1 肉芽肿性乳腺炎病原菌分布
Tab. 1 Distribution of pathogenic bacteria in granulomatous mastitis

病原菌	例数	构成比 /%
棒状杆菌 (属)	78	70.27
金黄色葡萄球菌	10	9.0
其他革兰阳性菌	7	6.3
表皮葡萄球菌	6	5.4
不动杆菌	2	1.8
路邓葡萄球菌	2	1.8
黏质沙雷菌	2	1.8
链球菌	1	0.9
肠炎沙门菌	1	0.9
大肠埃希菌	1	0.9
肺炎克雷伯菌	1	0.9
白念珠菌	1	0.9

表 2 肉芽肿性乳腺炎中分离的棒状杆菌类型分布 (板条鉴定法)
Tab. 2 Distribution of corynebacterium types isolated from granulomatous mastitis (CB PLUS)

病原菌	例数	构成比 (属中) /%	构成比 (总阳性) /%
微小棒状杆菌	37	47.43	33.33
G 群棒状杆菌	11	14.10	9.90
银色棒杆菌	6	7.69	5.40
无枝菌酸棒杆菌	3	3.85	2.70
纹带棒状杆菌	3	3.85	2.70
锯齿棒状杆菌	2	2.56	1.80
水生棒状杆菌	2	2.56	1.80
杰氏棒状杆菌	2	2.56	1.80
假结核棒杆菌	2	2.56	1.80
白喉棒状杆菌	1	1.28	0.90
干燥棒状杆菌	1	1.28	0.90

2.3 棒状杆菌药敏试验结果

收集肉芽肿性乳腺炎患者中分离的棒状杆菌共 30 株进行药敏试验，结果见表 3。

3 讨论

肉芽肿性乳腺炎是非哺乳期乳腺炎的一种，近年来发病率有上升的趋势，其不断增高的发病率威胁着女性健康^[4]。其发生机制目前仍存在着较大争议。Fletcher 等^[5]的研究认为自身免疫性因素在该疾病中起着重要因素。而近年来很多学者开始对棒状杆菌和肉芽肿性乳腺炎的关系进行关注。Fernández 等^[6]的研究报道了克氏棒杆菌为肉芽肿性乳腺炎的重要病原菌。因病因不明确，临床的治疗和治疗方法也存在争议，主要有类固醇激素治疗、免疫抑制剂治疗、手术以及抗生素使用^[7]。也有研究显示噬菌体疗法

表 3 30 株棒状杆菌分布及药敏试验结果
Tab. 3 Distribution of 30 corynebacterium and drug susceptibility test results

抗生素	G 群棒状杆菌	微小棒状杆菌	银色棒状杆菌	无枝菌酸棒杆菌	假结核棒状杆菌	其他棒状杆菌	合计敏感率 (敏感菌株 / 试验菌株)
青霉素	3/8	1/6	4/6	1/2	2/2	2/6	43.33% (13/30)
万古霉素	8/8	6/6	6/6	2/2	2/2	6/6	100.00% (30/30)
亚胺培南	3/8	3/6	4/6	1/2	2/2	2/6	50.00% (15/30)
美罗培南	3/8	4/6	4/6	1/2	2/2	2/6	53.33% (16/30)
庆大霉素	8/8	6/6	6/6	0/2	2/2	6/6	93.33% (28/30)
克林霉素	1/8	2/6	2/6	0/2	1/2	3/6	30.00% (9/30)
利奈唑胺	8/8	6/6	6/6	2/2	2/2	6/6	100.00% (30/30)
利福平	8/8	6/6	6/6	2/2	2/2	6/6	100.00% (30/30)

也可用于乳腺炎的治疗^[8]。若一般抗生素治疗无效，需换成治疗周期长达半年的抗分枝杆菌三联药物^[9]，所以选择合适的抗生素治疗非常重要。本院就诊于乳腺病防治中心的肉芽肿性乳腺炎患者占乳腺炎的3.88%。虽然发病率不高，但是这部分患者多反复就诊，容易给患者身心健康造成严重影响。

本研究中436例肉芽肿性乳腺炎患者标本细菌培养阳性者111例，而棒状杆菌阳性率是70.27%(78/111)，另外其他革兰阳性菌有7例，这部分细菌使用板条鉴定法未鉴定出，但是也不排除棒状杆菌的可能，表明棒状杆菌感染与肉芽肿性乳腺炎具有密切关系。本研究中肉芽肿性乳腺炎棒状杆菌分布主要以微小棒状杆菌和G群棒状杆菌为主，构成比为61.5%(48/78)。棒状杆菌阳性率、棒状杆菌类型分布与相关文献存在差别。Taylor等^[2]的研究中，棒状杆菌阳性率为45.00%，分离的棒状杆菌以谷氨酸棒状杆菌为主。本研究中棒状杆菌阳性率为70.27%，高于Taylor等^[2]的研究，且棒状杆菌类型分布不同。可能的原因为地区差异和方法学限制。在同属广东地区的刘晓雁等^[10]的研究中，棒状杆菌阳性率74.20%，以水生棒状杆菌和微小棒状杆菌为主，构成比分别为26.20%和21.30%，与本研究结果相对接近，说明可能存在地区差异。本研究中棒状杆菌鉴定采用板条鉴定法，原理是过氧化物酶、黑色素与鉴定板条上18种化学反应一起构成7组鉴定试验，得到7位编码数字鉴定到种。棒杆菌属各菌种间化学反应可能差别较小，且存在一些弱阳性结果影响判断，故方法学上差异可能也是导致菌株分布存在差异的原因之一。增强鉴定可靠性可使用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)或测定16S rDNA基因核酸序列在GenBank/NCBI基因库进行

BLAST同源比对鉴定。本研究下一步将会通过飞行时间质谱的方法对棒状杆菌进行鉴定研究。

本研究对30例棒状杆菌采用微量肉汤稀释法进行药敏试验，发现棒状杆菌对万古霉素、利奈唑胺、庆大霉素和利福平敏感性较高(>90%)，对青霉素、亚胺培南、美罗培南、克林霉素敏感率均低于55%，与文献^[11]相似，另外，文献指出棒状杆菌对β-内酰胺类抗生素较耐药，并可出现多重耐药情况。由于CLSI中没有棒状杆菌KB法的药敏标准，而本研究采用的是微量肉汤稀释法测定细菌的最小抑菌浓度，因此可以为临床治疗棒状杆菌提供可靠依据。

综上所述，棒状杆菌感染与肉芽肿性乳腺炎有着密切关系，细菌感染可能是肉芽肿性乳腺炎发病、疾病进展的原因之一，治疗时感染的控制和药敏结果应用不可忽略，伴有棒状杆菌感染的肉芽肿性乳腺炎可用万古霉素、利奈唑胺、庆大霉素和利福平等敏感性较高的药物进行治疗。

参考文献

[1] Kok K Y, Telisinghe P U. Granulomatous mastitis: presentation, treatment and outcome in 43 patients[J]. *Surgeon*, 2010, 8(4): 197-201.

[2] Taylor B G, Paviour S D, Musaad S, *et al*. A clinicopathological review of 34 cases of inflammatory breast disease showing an asso-ciation between corynebacteria infection and granulomatous mastitis[J]. *Pathology*, 2003, 35(2): 109-119.

[3] Clinical and Laboratory Standards Institute. M45 methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated of fastidious bacteria[S]. *Wayne, PA: CLSI*.

[4] 吕佳奇, 杨靖靖, 贡旭楠, 等. 妊娠期急性化脓性乳腺炎合并重症感染的临床疗效观察 [J]. *中国妇幼保健*, 2014, 29(15): 2404-2405.

- [5] Altintoprak F I, Karakece E, Kivilcim T, *et al*. Idiopathic granulomatous mastitis: an autoimmune disease[J]. *Sci World J*, 2013, 9(4): 1-5.
- [6] Fernández-Natal M I, Soriano F, Ariza-Miguel J, *et al*. draftgenome sequences of corynebacterium kroppenstedtii CNM633/14 and CNM632/14, multidrug-resistant and antibiotic-sensitive isolates from nodules of granulomatous mastitis patients[J]. *Gen Announc*, 2015, 3(3): 525-530.
- [7] 王颀, 杨剑敏, 于海静. 肉芽肿性乳腺炎的诊断与处理原则 [J]. 中国实用外科杂志, 2016, 36(7): 734-738.
- [8] 耿慧君, 张美霞, 徐永平, 等. 噬菌体在奶牛乳腺炎防控中的应用 [J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(09): 724-730.
- [9] 屠道远, 甄林林, 李振, 等. 非哺乳期乳腺炎病因学研究进展 [J]. 中华乳腺病杂志 (电子版), 2018, 12(01): 55-59.
- [10] 刘晓雁, 佟琳, 罗强, 等. 肉芽肿性小叶性乳腺炎细菌学分析 [J]. 广东医学, 2016, 37(16): 2454-2456.
- [11] Dobinson H C, Anderson T P, Chambers S T, *et al*, Antimicrobial treatment options for granulomatous mastitis caused by *Corynebacterium* species[J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(9): 2895-2899.