

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.01.010

宏基因组学第二代测序技术在慢性子宫内膜炎患者中的应用分析^{*}黄高波, 彭 芳, 李 诚, 龚燕飞[△]

岳阳市中心医院生殖中心, 湖南岳阳 414500

摘 要:目的 研讨宏基因组学第二代测序在慢性子宫内膜炎(CE)患者微生物检测中的应用及后续对治愈率的影响。方法 选取 2017 年 1 月至 2020 年 12 月在该院生殖中心诊断为 CE 的不孕不育患者共 139 例作为研究对象,随机分为两组进行子宫内膜标本微生物培养和宏基因组学第二代测序检测,分析两组的微生物阳性率和 CE 治愈率。结果 组 1 微生物检测阳性患者 17 例,阳性率为 20.00%;组 2 微生物检测阳性患者 43 例,阳性率为 79.63%,差异有统计学意义($P<0.05$);两组进行相应的抗菌药物治疗后,组 2 的治愈率显著高于组 1,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 利用宏基因组二代测序的方法,能显著提高患者子宫内膜微生物检测的阳性率和 CE 患者的治愈率。

关键词:慢性子宫内膜炎; 宏基因组学第二代测序; 治愈率; 微生物检验

中图法分类号:R711.32

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)01-0036-04

Application analysis of metagenomics next generation sequencing technology
in patients with chronic endometritis^{*}

HUANG Gaobo, PENG Fang, LI Cheng, GONG Yanfei[△]

Reproductive Center, Yueyang Central Hospital, Yueyang, Hunan 414500, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of metagenomics next generation sequencing on the positive rate of microorganism and cure rate in patients with chronic endometritis (CE). **Methods** A total of 139 infertility patients diagnosed with CE in the reproductive center of a hospital from January 2017 to December 2020 were selected as the research subjects. And randomly divided into two groups for microbial culture and metagenomics next generation sequencing of endometrium specimens. Then the positive rate of microorganism and CE cure rate of the two groups were analyzed. **Results** In group 1, 17 patients were positive for microorganism, the positive rate was 20.00%. In group 2, 43 patients were positive for microorganism, the positive rate was 79.63%, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). After the two groups were treated with antibiotics, the cure rate of group 2 was significantly higher than that of group 1, with statistical significance ($P<0.05$). **Conclusion** Metagenomics next generation sequencing can significantly improve the positive rate of microorganisms and the cure rate of CE patients.

Key words: chronic endometritis; metagenomics next generation sequencing; cure rate; microbiological testing

慢性子宫内膜炎(CE)是发生在子宫内膜上的慢性炎症,一般情况下无明显症状,或者伴有轻微的症状,病理检测显示主要以子宫内膜间质的浆细胞浸润为特征^[1]。研究表明,在妇科疾病中 CE 的患病率为 10%~11%^[2]。因 CE 临床症状表现轻微,容易受到妇科医生和病理学专家的忽视^[3]。在辅助生殖的研究中发现,CE 显著影响患者的胚胎着床,以及后续的胚胎发育,造成反复着床失败(RIF)或复发性流产(RPL)^[4]。研究发现,在 RIF 或 RPL 患者中,CE 的

发病率要显著高于健康人群^[5]。CE 诊断基于组织病理学鉴定浆细胞,子宫内膜微生物检测则能为治疗提供客观、可靠的指导信息^[6]。因此,如何能快速、有效地诊断出 CE 患者的微生物感染类型,在临床上有着重大意义。

微生物宏基因组学第二代测序(mNGS),检测覆盖范围大,病毒、细菌、真菌、寄生虫都能被同时检测^[7],并且有着较高的灵敏度。在临床上使用越来越多,如对脑脊液、血液及呼吸道感染部位进行检测,结

^{*} 基金项目:岳阳市科技发展计划专项资金项目(2069999)。

作者简介:黄高波,男,副主任技师,主要从事临床医学检验研究。 [△] 通信作者, E-mail: Yanfei_G@126.com。

本文引用格式:黄高波,彭芳,李诚,等.宏基因组学第二代测序技术在慢性子宫内膜炎患者中的应用分析[J].检验医学与临床,2022,19

果显示 mNGS 可提高病原体的阳性率^[8-9]。在 CE 患者中,用 mNGS 对病原体进行检测的研究较少。本研究拟探讨 mNGS 在 CE 患者子宫内膜微生物检测的有效性,并与传统的微生物培养进行对比,观察其对微生物检测的阳性率及后续对 CE 患者治愈率的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 1 月至 2020 年 12 月在本院生殖中心诊断为 CE 的不孕不育患者共 139 例作为研究对象。研究对象在进行子宫内膜取样前均未使用任何抗菌药物治疗。患者年龄 22~44 岁,平均年龄为 (33.05 ± 5.03) 岁。研究对象符合 CE 诊断标准^[10]。将 139 例研究对象随机分为组 1、组 2,子宫内膜取样后进行微生物培养检测的患者 85 例作为组 1,子宫内膜取样后进行 mNGS 检测的患者 54 例作为组 2。

1.2 子宫内膜宫腔取样

1.2.1 通过负压取样器吸取宫腔标本 为防止阴道内细菌对标本的影响,清洗外阴后,放置窥阴器,然后用碘伏溶液浸泡纱布擦洗宫颈口,生理盐水棉拭子擦除宫颈外口黏液。之后用全封闭的负压取样器进行内膜取样,取出的标本密封无菌保存送至实验室,用于病原体培养或病原体全基因组测序。

1.2.2 通过宫腔镜进行组织取样 女性在月经期干净后,接受宫腔镜探查术后,对子宫内可疑感染组织进行取样,在进行取样操作时,为避免阴道内细菌的污染,对外阴清洗后放置窥阴器,之后对宫颈口进行碘伏擦洗消毒。组织取出后不要碰到阴道壁。将标本分为 2 份,1 份用于病原体检查(病原体培养标本直接送检,用于 mNGS 标本放于细胞保存液中, $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存送至实验室),另外 1 份用福尔马林进行固定,用于病理学检查和免疫学检查。

1.3 微生物培养 细菌及真菌培养:标本分别接种在巧克力琼脂平板、麦康凯平板和哥伦比亚血琼脂平板、沙保罗平板(郑州安图公司),对其实施分区划线进行接种。在 35°C 及 5% 二氧化碳培养箱中进行需氧培养,放入厌氧袋厌氧(法国生物梅里埃)培养,孵育时间为 48~72 h。

1.4 mNGS

1.4.1 标本处理和 DNA 提取 取子宫内膜活检标本,超声破碎后,按照 TIANamp Micro DNA kit (DP316,天根生化科技有限公司,中国)试剂盒步骤提取 DNA。

1.4.2 文库构建和测序 采用 Agilent 2100 Bioanalyzer 质控文库插入 DNA 片段,使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher,美国)按操作说明对 DNA 文库浓度进行质控分析,经环化形成单链环形

结构。环化后的文库经滚环复制生成 DNA 纳米球(DNB)。制备好的 DNB 加载到测序芯片,使用 Bio-electronSeq4000 进行测序。测序数据去除低质量和长度小于 35 bp 的数据以获得高质量数据,通过比对,将高质量数据中比对上人参考基因组序列的数据去除。去除低复杂度序列后与微生物大数据库比对,并将比对后的数据按照病毒、细菌、真菌和寄生虫进行分类排列。

1.5 CE 治疗 确诊为 CE 患者,根据病原微生物的检测结果进行相对的治疗。如对革兰阳性细菌感染采用阿莫西林联合克拉维酸治疗,对革兰阴性细菌感染采用环丙沙星治疗,对支原体感染采用交沙霉素治疗。而对于病原体检测阴性的患者采用广谱抗菌药物治疗,如采用多西环素、甲硝唑和头孢曲松联合治疗^[11]。在治疗后的卵泡期,所有患者再次进行宫腔镜检查 and 病理学检查。如果宫腔镜和病理学检查结果均正常,则治疗结果,患者判断为治愈,治疗时间不超过 3 个月。

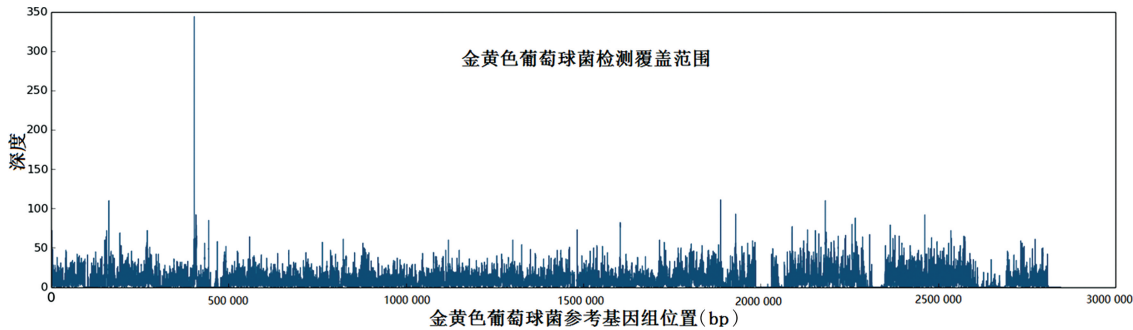
1.6 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件进行数据分析,数据比对主要采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组 1、组 2 微生物检测阳性率比较 组 1 微生物检测阳性患者 17 例,阳性率为 20.00%;组 2 微生物检测阳性患者 43 例,阳性率为 79.63%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在本研究中阳性结果表示微生物置信度中度以上,置信度水平由微生物鉴定宏基因组通道技术(MAPMI)内置模型计算得出。高置信度指确定标本中客观存在检出物种,如图 1 中显示高度置信金黄色葡萄球菌感染;中置信度指大概率确定标本中客观存在检出物种,如图 2 中显示中度置信铜绿假单胞菌感染。疑似结果指不太确定标本中是否存在检出物种,本研究中不纳入阳性结果,如图 3 中显示疑似解脲脲原体感染。

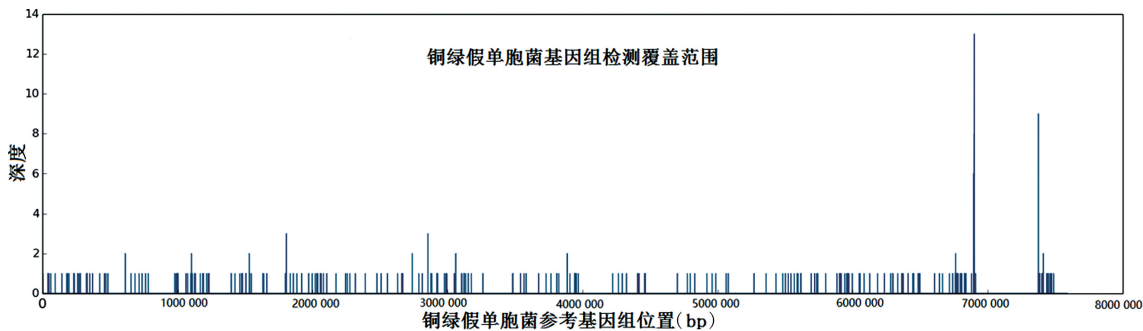
2.2 组 1、组 2 病原体检出频率比较 组 1 的 85 例患者中,阳性结果为 17 例。其检测出的全部是常见的条件致病菌,如肺炎克雷伯杆菌 3 例、大肠埃希菌 3 例、链球菌 4 例、解脲脲原体 2 例,金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、嗜麦芽窄食单胞菌、铜绿假单胞菌、人型支原体各 1 例,未检出合并感染情况。组 2 的 54 例患者中,阳性结果为 43 例;除了检测出的常见的条件致病菌外,还检测出了多例常规培养中不易发现的细菌和病毒,如肺炎克雷伯杆菌 6 例,大肠埃希菌、链球菌、脆弱杆菌各 5 例,解脲脲原体 4 例,阴道加德纳菌、粪肠球菌、变形杆菌、人型支原体各 3 例,金黄色葡萄球菌、嗜麦芽窄食单胞菌、铜绿假单胞菌、普雷沃菌、结核分枝杆菌各 2 例,检测出病毒如巨细胞病毒 5

例、人乳头状瘤病毒 3 例,人型疱疹病毒 2 例及细环 病毒、支原体。病毒 1 例。组 2 中有 12 例患者同时检测出了细菌和



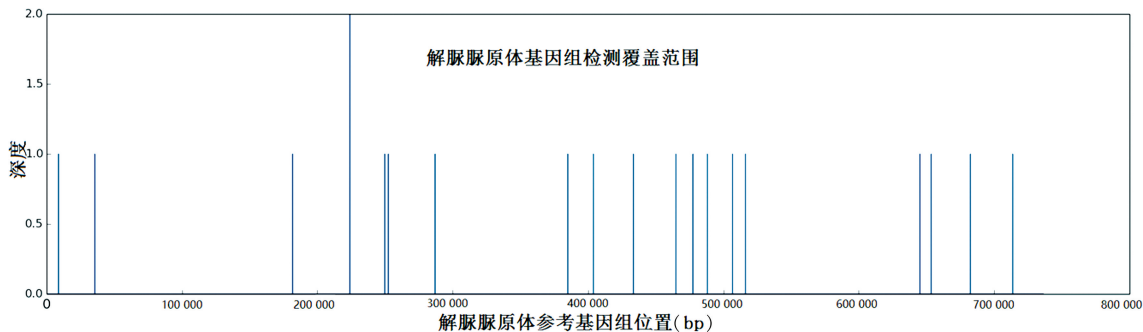
注:本次检查参考序列来源于金黄色葡萄球菌 GCA_000626615.3,标本覆盖率为 84.37%,平均深度为 11.0×(测序得到的总碱基数与待测基因组大小的比值)。

图 1 mNGS 检测出高度置信子宫内膜金黄色葡萄球菌感染结果



注:本次检查参考序列来源于铜绿假单胞菌 GCA_00478465,标本覆盖率为 0.54%,平均深度为 1.4×(测序得到的总碱基数与待测基因组大小的比值)。

图 2 mNGS 检测出中度置信子宫内膜铜绿假单胞菌感染结果



注:本次检查参考序列来源于解脲脲原体 GCA_000828735.1,标本覆盖率为 0.34%,平均深度为 1.1×(测序得到的总碱基数与待测基因组大小的比值)。

图 3 mNGS 检测疑似子宫内膜解脲脲原体感染结果

2.3 两组 CE 治愈率比较 组 1 的 85 例患者中,有 44 例患者治愈,治愈率为 51.76%;组 2 的 54 例患者中,有 43 例患者治愈,治愈率为 79.63%。组 2 的治愈率显著高于组 1,差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨 论

在不孕不育的患者中,CE 的发病率较高。引起 CE 的一个主要因素就是微生物感染。研究者们从 CE 患者子宫内膜中发现了多种不同类型的微生物,有需氧菌、微需氧菌、厌氧菌、支原体、衣原体及病毒等^[12-13]。由于微生物的特性及耐药性的不同,子宫内膜炎患者需要不同的用药方案进行治疗。抗菌药物

的盲目使用会造成人身体内微生物菌群的失调及增加细菌的耐药性,更不利于胚胎的着床和发育。

因此,如何有效地检测出女性宫腔内的致病微生物并对其进行治疗,在辅助生殖技术中有着非常重大的意义。大多数学者使用微生物培养方法,很少有学者用 mNGS 技术去研究子宫内膜病原微生物及对 CE 治愈率的影响。

本研究结果显示,微生物培养的方法微生物阳性率为 20.00%,与文献^[14-15]报道结果相似;mNGS 的方法微生物阳性率为 79.63%,显著要高于微生物培养方法。对比了两组检出微生物类型,结果显示微

生物培养检出的微生物主要以常规的条件致病菌为主,如肺炎克雷伯杆菌、大肠埃希菌、链球菌、支原体等,而在 mNGS 组中,除了发现了这些常规的条件致病菌外,还发现了较多用常规培养的方法难以检测的病原体,如脆弱杆菌、普雷沃菌、结核分枝杆菌和病毒等。mNGS 检测在微生物检测上的应用优势在于其有着较广的覆盖范围,且能检测到一些难以发现的病原体。本研究结果中,通过 mNGS 检测,显著提高微生物的阳性率,有效地检测出多种罕见的病原体和多种病原体混合感染的情况。本研究结果显示,在治疗 3 个月后,组 2 的治愈率显著高于组 1,差异有统计学意义($P < 0.05$),本研究的治愈率高于文献[16]的报道结果。

自从 mNGS 首次被用于临床病原学诊断后,其应用也越来越广泛。很多研究结果表明其在特异度无差别的情况下,能显著提高检测的灵敏度^[17],很适用于临床上不明、少见及不典型症状的检测。在本研究中,利用 mNGS 技术诊断,得到了较好的临床结局,但是广泛应用于 CE 的诊断,仍然存在不少的挑战。如在采集过程中对无菌操作要求较高;mNGS 技术对实验室要求较高,能开展的实验室较少;相对于普通的培养和 PCR 检测,mNGS 花费较高,部分患者难以接受。因此,mNGS 虽然能显著提高 CE 的微生物检验效率,仍然需要更多的研究来提高 mNGS 在临床上的可操作性,以及技术上的革新来降低检测成本。

综上所述,对于 CE 患者利用 mNGS 的方法,能显著提高患者子宫内膜微生物检测的阳性率,并且进行针对性的药物治疗后,能显著提高 CE 患者的治愈率。虽然目前在临床全面应用还存在一定困难,但 mNGS 作为一种新型的微生物检测手段,对子宫内膜微生物检测有较大的应用价值和应用前景。

参考文献

- [1] 刘帅斌,胡丽娜.慢性子宫内膜炎的发病因素及预防[J].中国妇产科临床杂志,2020,21(2):207-209.
- [2] KITAYA K, YASUO T. Immunohistochemical and clinicopathological characterization of chronic endometritis[J]. Am J Reprod Immunol, 2011, 66(5): 410-415.
- [3] 叶海花,陆丽美,王兴,等.慢性子宫内膜炎与生殖预后的关系及其研究进展[J].国际妇产科学杂志,2020,47(6):705-711.
- [4] ROMERO R, ESPINOZA J, MAZOR M. Can endometrial infection/inflammation explain implantation failure, spontaneous abortion, and preterm birth after in vitro fertilization[J]. Fertil Steril, 2004, 82(4): 799-804.
- [5] KHAN K N, FUJISHITA A, KITAJIMA M, et al. Intra-

- uterine microbial colonization and occurrence of endometritis in women with endometriosis[J]. Hum Reprod, 2014, 29(11): 2446-2456.
- [6] 陈丽娜,王秀霞.慢性子宫内膜炎诊断方法的研究进展[J].中国实用妇科与产科杂志,2021,37(2):245-247.
- [7] WILSON M R, SAMPLE H A, ZORN K C, et al. Clinical metagenomic sequencing for diagnosis of meningitis and encephalitis[J]. N Engl J Med, 2019, 380(24): 2327-2340.
- [8] CHIU C Y, MILLER S A. Clinical metagenomics[J]. Nat Rev Genet, 2019, 20(6): 341-355.
- [9] BROWN J R, BHARUCHA T, BREUER J. Encephalitis diagnosis using metagenomics: application of next generation sequencing for undiagnosed cases[J]. J Infect, 2018, 76(3): 225-240.
- [10] CICINELLI M, MATTEO M, TINELLI R, et al. Chronic endometritis due to common bacteria is prevalent in women with recurrent miscarriage as confirmed by improved pregnancy outcome after antibiotic treatment[J]. Reprod Sci, 2014, 21(5): 640-647.
- [11] CICINELLI E, MATTEO M, TINELLI R, et al. Prevalence of chronic endometritis in repeated unexplained implantation failure and the IVF success rate after antibiotic therapy[J]. Hum Reprod, 2015, 30(2): 323-330.
- [12] MORENO I, CICINELLI E, IOLANDA G G, et al. The diagnosis of chronic endometritis in infertile asymptomatic women: a comparative study of histology, microbial cultures, hysteroscopy, and molecular microbiology[J]. Am J Obstet Gynecol, 2018, 218(6): 601-602.
- [13] GIRALDO-ISAIZA M A, JASPAN D, COHEN A W. Postpartum endometritis caused by herpes and cytomegaloviruses[J]. Obstet Gynecol, 2011, 117(2): 466-467.
- [14] KITAYA K, MATSUBAYASHI H, TAKAYA Y, et al. Live birth rate following oral antibiotic treatment for chronic endometritis in infertile women with repeated implantation failure[J]. Am J Reprod Immunol, 2017, 78(5): 12719-12721.
- [15] MAHVASH Z, MEHRI G, ROSHAN N, et al. Evaluating chronic endometritis in women with recurrent implantation failure and recurrent pregnancy loss by hysteroscopy and immunohistochemistry[J]. J Minim Invasive Gynecol, 2020, 27(1): 116-121.
- [16] PARK H J, KIM Y S, YOON T K, et al. Chronic endometritis and infertility[J]. Clin Exp Reprod Med, 2016, 43(4): 185-192.
- [17] PAN T T, TAN R M, QU H P, et al. Next-generation sequencing of the BALF in the diagnosis of community-acquired pneumonia in immunocompromised patients[J]. J Infect, 2019, 79(1): 61-74.