

Aplicación de la Secuenciación masiva de cadenas largas del gen 16S ARNr para la identificación de especies bacterianas causantes de infección protésica articular

Dra Sònia Molinos Abós

Microbiology Department, Laboratori Clínic Metropolitana Nord. Germans Trias i Pujol University Hospital (HUGTiP), Germans Trias i Pujol Research Institute (IGTP), Badalona, Spain.

La **infección de prótesis articular (IPA)** es la causa más frecuente de fracaso de artroplastia total. Las cirugías de prótesis articular son cada vez más comunes debido al envejecimiento de la población y una mayor expectativa de vida.

Hasta el 10% de las cirugías de prótesis articular primaria derivan en infección.

Hasta el 40% de las cirugías de revisión derivan en infección.



El diagnóstico rápido y preciso es esencial para evitar complicaciones y para establecer un tratamiento dirigido y reducir y reducir los costos asociados



Diagnóstico Microbiológico

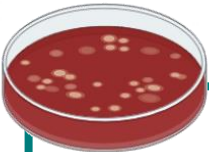
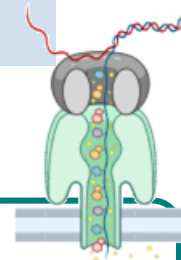
>85% dels casos de PJI amb cultiu negatiu

Major criteria (at least one of the following)	Decision
Two positive cultures of the same organism	Infected
Sinus tract with evidence of communication to the joint or visualization of the prosthesis	

Preoperative Diagnosis	Minor Criteria		Score	Decision
	Serum	Elevated CRP <u>or</u> D-Dimer	2	≥6 Infected 2-5 Possibly Infected ^a 0-1 Not Infected
		Elevated ESR	1	
	Synovial	Elevated synovial <i>WBC count</i> <u>or</u> <i>LE</i>	3	
		Positive alpha-defensin	3	
		Elevated synovial PMN (%)	2	
		Elevated synovial CRP	1	

Intraoperative Diagnosis	Inconclusive pre-op score <u>or</u> dry tap ^a	Score	Decision
	Preoperative score	-	≥6 Infected
	Positive histology	3	4-5 Inconclusive ^b
	Positive purulence	3	
	Single positive culture	2	

Cultivo positivo versus Secuenciación gen 16S ARNr



Gold standard: Cultivo positivo

Procesamiento complejo y retraso en el resultado
(carga bacteriana baja, bacterias de crecimiento lento, cultivos negativos)

Sensibilidad limitada
>45% IPA cultivos negativos
(tratamiento antibiótico, bacterias no cultivables o de crecimiento lento o dificultoso)

Dificultad en la interpretación
(microbiota de la piel, infecciones polimicrobianas)

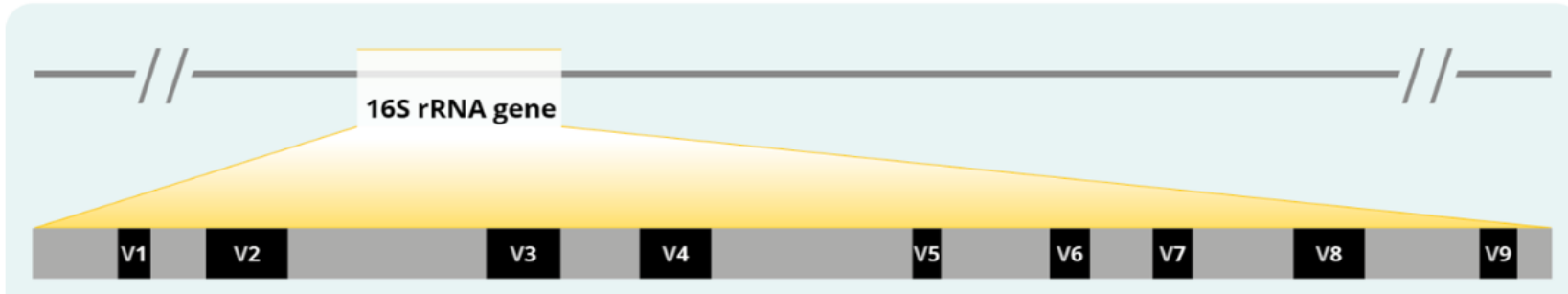
Secuenciación gen 16S ARNr de muestra directa

Diagnóstico rápido y detección de microorganismos de crecimiento lento o difíciles de cultivar

No depende del cultivo, alternativa a IPA con cultivo negativo

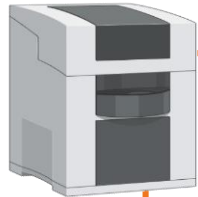
Identificación de infecciones polimicrobianas

Secuenciación de lectura larga del gen 16S ARNr



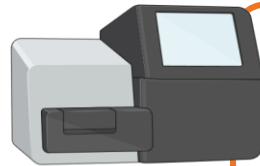
V1-V3

V3-V4



Sanger

No se detectan
infecciones
polimicrobianas



Illumina

Secuenciación no flexible

Regiones variables del gen 16S
Lectura corta

Resolución taxonómica limitada

V1-V9 (Full-length ~ 1,500 bp)



Oxford Nanopore Technologies (ONT)

Rápida, flexible, de fácil uso e interpretación con resultados en
tiempo real

Análisis completo del gen 16S

Mejora la resolución taxonómica

J Clin Microbiol. 2012 Mar; 50(3): 583–589.

doi: [10.1128/JCM.00170-11](https://doi.org/10.1128/JCM.00170-11)

PMCID: PMC3295163

PMID: [22170934](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22170934/)

Sanger

Role of Universal 16S rRNA Gene PCR and Sequencing in Diagnosis of Prosthetic Joint Infection

[M. Marín](#),^{✉a} [J. M. Garcia-Lechuz](#),^a [P. Alonso](#),^{b,*} [M. Villanueva](#),^c [L. Alcalá](#),^a [M. Gimeno](#),^d [E. Cercenado](#),^a
[M. Sánchez-Somolinos](#),^a [C. Radice](#),^a and [E. Bouza](#)^a

Illumina

[Clin Infect Dis](#). 2023 Feb 1; 76(3): e1456–e1462.

Published online 2022 Aug 9. doi: [10.1093/cid/ciac646](https://doi.org/10.1093/cid/ciac646)

PMCID: PMC10169413

PMID: [35944127](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35944127/)

Targeted Versus Shotgun Metagenomic Sequencing-based Detection of Microorganisms in Sonicate Fluid for Periprosthetic Joint Infection Diagnosis

[Hyo-Lim Hong](#), [Laure Flurin](#), [Matthew J Thoendel](#), [Matthew J Wolf](#), [Matthew P Abdel](#), [Kerryl E Greenwood-Quaintance](#),
and [Robin Patel](#)[✉]

Nanopore 16S amplicon sequencing enables rapid detection of pathogen in knee periprosthetic joint infection

[Hyuk-Soo Han](#)^a, [Du Hyun Ro](#)^a, [Jeehyeok Chung](#)^a, [Narae Kim](#)^b, [Jangsup Moon](#)^{b,c,*}

^a Department of Orthopaedic Surgery, Seoul National University College of Medicine, Seoul, South Korea

^b Department of Neurology, Seoul National University Hospital, Seoul, South Korea

^c Department of Genomic Medicine, Seoul National University Hospital, Seoul, South Korea

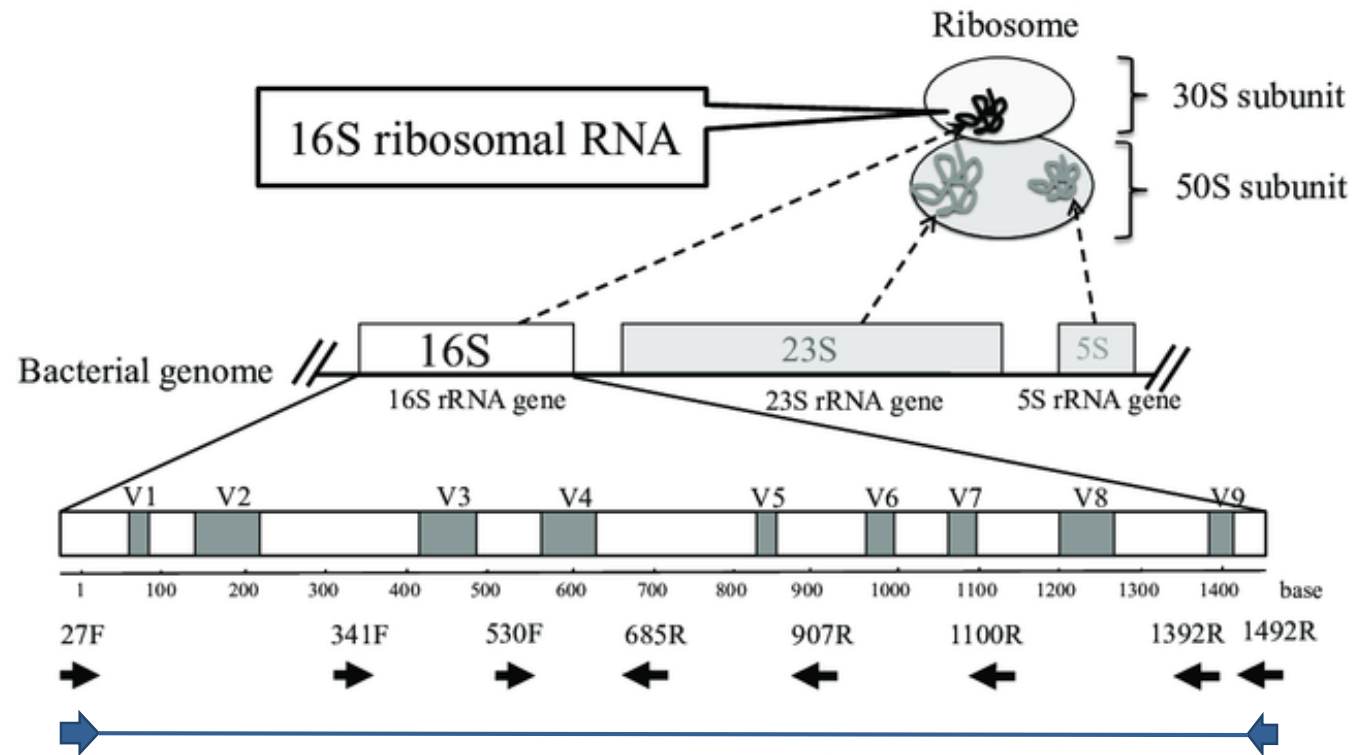
2022

Oxford Nanopore Technologies

n= 36 casos → 22 clasificados como infección según criterios MSIS (14 considerados como no infección)

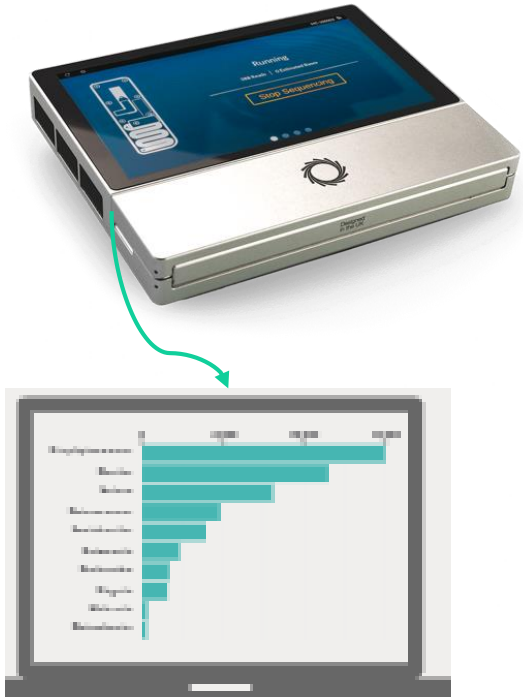
- 19 casos con cultivo positivo → concordancia del 74% (14/19)
- 3 casos con cultivo negativo → concordancia del 100%

Amplificación y secuenciación por nanoporos del gen ARNr 16S completo



Mejora de la resolución taxonómica

<https://www.youtube.com/watch?v=RcP85JHLmnl>

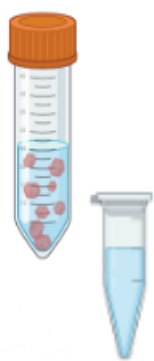


Objetivo: Validar e implementar la secuenciación masiva de lecturas largas para una rápida identificación de especies bacterianas causantes de IPA

Diseño del estudio

Estudio unicéntrico y retrospectivo
(2022-2023)

Gold Standard:



Tejido/ Sonicado/
Líquido articular

Cultivo convencional

Identificación del aislamiento
MALDI Biotyper (Bruker Daltonics)

Tiempo de respuesta:
2-9 días

12 casos sospecha IPA

6 casos amb cultivo positivo

Localització:

Rodilla, cadera, hombro y
columna

Tipo de muestra:

Líquido articular y/o tejido

6 casos con cultivo negativo

Localització:

Rodilla, cadera y
hombro

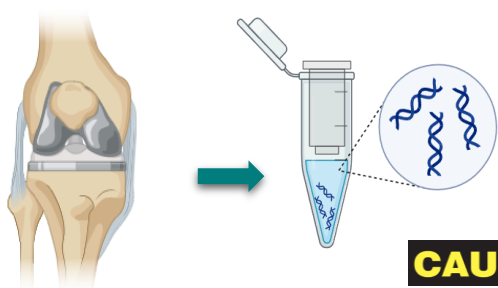
Tipo de muestra:

Líquido articular y/o
tejido

Amplificación y secuenciación por nanoporos del gen ARNr 16S completo

Tiempo de respuesta: 1-3 días

Extracción del ADN



25-50mg tejido / 1mL sonicado prótesis o líquido articular

Adición control negativo extracción
QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)

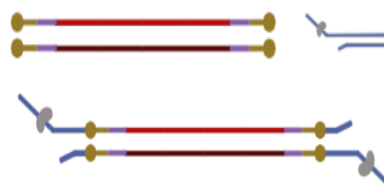
4h

Amplificación, preparación de librerías y pooling

1. PCR con *primers* 16S + índexs



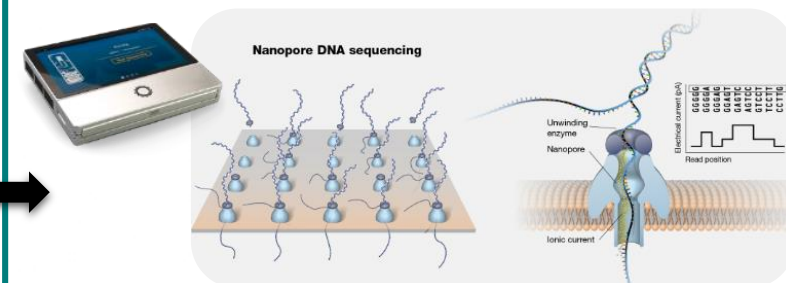
2. Adición adaptadores de seq



Adición control positivo librerías
16S Barcoding Kit (ONT)

3h

Secuenciación e interpretación de resultados en tiempo real



Secuenciador MinION Mk1C (ONT)



EMU
pipeline

2h o overnight



Resultados casos con cultivo positivo

Caso	Tipo de muestra	Localització	Resultado cultivo	Resultado seq 16S	Comparativa	TAT cultivo (días)
1	Líquido articular (n=3) i teixit (n=3)	Rodilla	<i>S. aureus</i> (4/6)	<i>S. aureus</i> (6/6)	Concordante	2
2	Tejido (n=4)	Cadera	<i>Enterococcus faecalis</i> (4/4)	<i>E. faecalis</i> (2/4)	Concordante	3
3	Líquid articular (n=1) i teixit (n=4)	Espatlla	<i>S. aureus</i> (5/5)	<i>S. aureus</i> (5/5)	Concordante	2
4	Tejido (n=5)	Columna	<i>E. faecalis</i> (4/5)	<i>E. faecalis</i> / <i>Bacteroides fragilis</i> (4/5)	Concordante (información adicional por seq)	3
5	Tejido (n=3)	Cadera	<i>C. acnes</i> (3/3)	Negativo* (3/3)	Discordante	9
11	Tejido (n=4)	Cadera	<i>Staphylococcus lugdunensis</i> (3/4)	Negativo** (4/4)	Discordante	5

*Baja carga bacteriana (positivo para *C. acnes* en cultivo al 9eno día)

**Confirmación del resultado por duplicado des del eluido (no se disponía de muestra original para repetir extracción)

Concordancia del 66,7% (4/6)

Resultados casos con cultivo negativo

Caso	Tipo de muestra	Localització	Resultado cultivo	Resultado seq 16S	Comparativa	TAT cultiu (días)
6	Tejido (n=4)	Rodilla	Negativo (4/4)	Negativo (4/4)	Concordante	9
7	Tejido y sonicado (n=2)	Cadera	Negativo (1/2)	Negativo (2/2)	Concordante	9
8	Líquido articular (n=2)	Hombro	Negativo (2/2)	Negativo (2/2)	Concordant	9
9	Líquido articular (n=1) i teixit (n=4)	Cadera	Negativo (5/5)	Negativo(5/5)	Concordante	9
10	Líquido articular (n=2) i teixit (n=2)	Rodilla	Negativo (4/4)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (2/4)*	Discordante	9
12	Tejido (n=3)	Cadera	Negativo(3/3)	Negativo (3/3)	Concordante	9

*Confirmado per un hemocultiu positiu (paciente con tratamiento antibiótico por endocarditis infecciosa)

Concordancia del 83,3% (5/6)

Conclusiones

- *La concordancia de resultados entre el cultivo y la secuenciación del gen 16S ARNr en pacientes con IPA fue del 75% (9/12).*
- *La secuenciación del gen completo de 16S ARNr mediante la metodología ONT es una línea prometedora para complementar el diagnóstico microbiológico de las IPA, con un tiempo de respuesta rápido, fundamental para el manejo de este tipo de infecciones.*
- *La validación adicional de estos resultados preliminares y su aplicación en el diagnóstico requiere un estudio más gran y prospectivo, en el cual los resultados deberán ser interpretados por un equipo multidisciplinar.*

Agradecimientos

Microbiology Department



– Bacteriology Unit –

S. Molinos
MD. Quesada
A. Llop-Agüero
B. Rodríguez-Ponga



P.J. Cardona, M. Giménez



Sequencing Unit Pathogens Diagnostics and Genomic Epidemiology Group

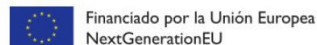
A.E. Bordoy
S. González-Gómez
O. Pérez
A. París
AC. Coello
M. de Homdedeu
S. Martínez-Puchol
V. Saludes
E. Martró

Department of Infectious Diseases

E. Reynaga
J. Díez de los Ríos
A. Vivero

Department of Orthopaedic Surgery and Traumatology

G. Pedemonte
JA. Hernández-Hermoso
VJ. López-Pérez



Moltes gràcies per l'atenció!

