GEIO
GRUPO DE ESTUDIO DE LA INFECCIÓN OSTEOARTICULAR
seimc

XI Reunión Científica GEIO

Grupo de Estudio de Infección Osteoarticular - SEIMC

Osteomielitis vertebral

Novedades en el diagnóstico microbiológico. ¿Qué aportan las pruebas de biología molecular?

Juan M. García-Lechuz
HU Miguel Servet
Zaragoza

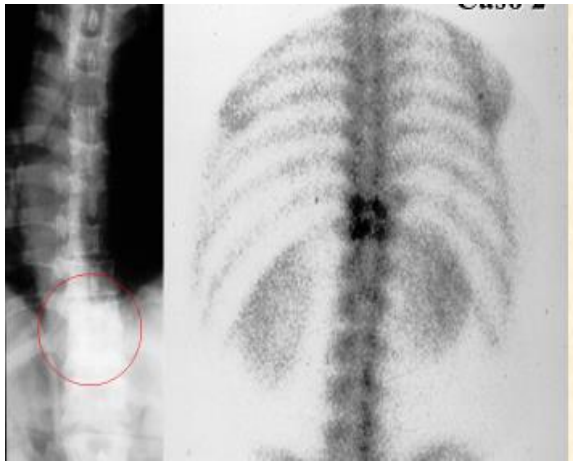


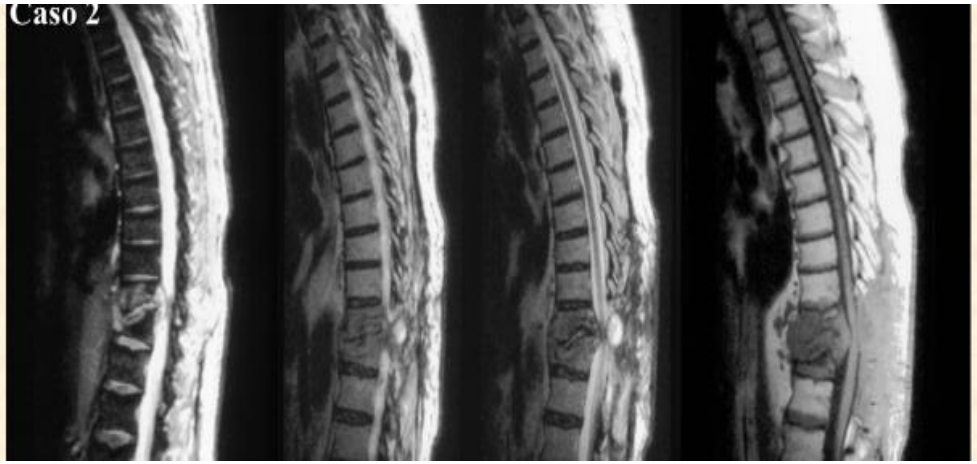
- Guión

1. Introducción
2. Técnicas moleculares
3. Ventajas e inconvenientes
4. Limitaciones
5. Protocolo de toma de muestras

Conclusiones

1. Introducción





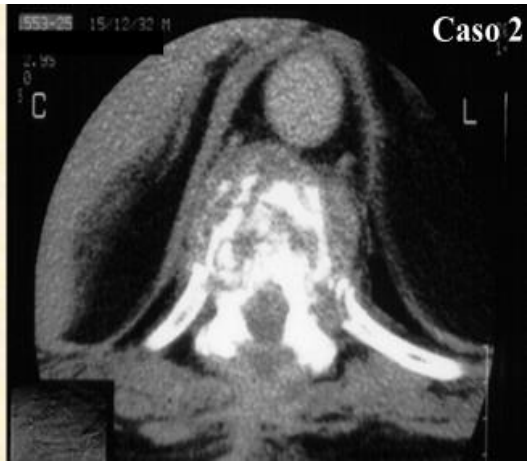


Table 1
Comparative features and incidence of bacterial causes of vertebral osteomyelitis (VO).

Microbiology[a]	Incidence (%)	Route of infection
Staphylococcus aureus	20–84	Most common pathogen; 1.7–6% of bloodstream infections complicated by VO
Coagulase-negative staphylococci	5–16	Device-related bacteraemia or direct inoculation in post-operative infections
Streptococci and enterococci	5–20	Haematogenous spread. Associated with infective endocarditis in 26%
Enterobacteriaceae	7–33	Haematogenous spread from urinary tract infections in older population. Commonly *Escherichia coli, Proteus, Klebsiella, Enterobacter* spp.
Anaerobes	<4	Contiguous spread from pelvic or intra-abdominal foci. *Cutibacterium acnes* direct inoculation from implants
Polymicrobial	<10	Contiguous spread

Saed K et al. Hot topics on vertebral osteomyelitis from the International Society of Antimicrobial Chemotherapy. *International Journal of Antimicrobial Agents 54 (2019) 125–133*

Espondilodiscitis tuberculosa o enfermedad de Pott:
experiencia en un hospital general

Juan M. García-Lechuz, Raúl Julve, Luis Alcalá, María J. Ruiz-Serrano y Patricia Muñoz

Enferm Infecc Microbiol Clin 2002;20(1):5-9

TABLA 3. **Distribución diagnóstica de los casos de enfermedad de Pott (n = 14)**

Certeza	6 casos	Cultivo biopsia ósea positivo *M. tuberculosis*	5 casos	Sólo cultivo + Cultivo, AP Cultivo, AP, PPD + Cultivo, PPD + y TBC otra localización	Caso 1 Caso 3 Casos 7 y 11 Caso 13
		Cultivo esputo positivo *M. tuberculosis* + AP ósea	1 caso		Caso 4
Probable*	8 casos	AP ósea sin cultivo (2 negativo, 2 no realizada)	4 casos	AP sola AP y PPD +	Casos 2 y 12 Casos 8 y 9
		Tuberculosis en otra localización	4 casos	PPD + PPD –	Casos 5 y 6 Casos 10 y 14

*El diagnóstico de probabilidad implica buenas evolución y respuesta al tratamiento antituberculoso empírico. PPD: test tuberculina; TBC tuberculosis en otra localización; AP: histología compatible.

Xpert MTB/RIF Ultra: La vía rápida (Fast-Track)





Semanas (Cultivo Tradicional)

Horas (Xpert Ultra)

FAST-TRACK

La Regla de Oro

Debe solicitarse en el **momento** de la **primera biopsia**, nunca como una prueba de rescate tardía.

Rendimiento

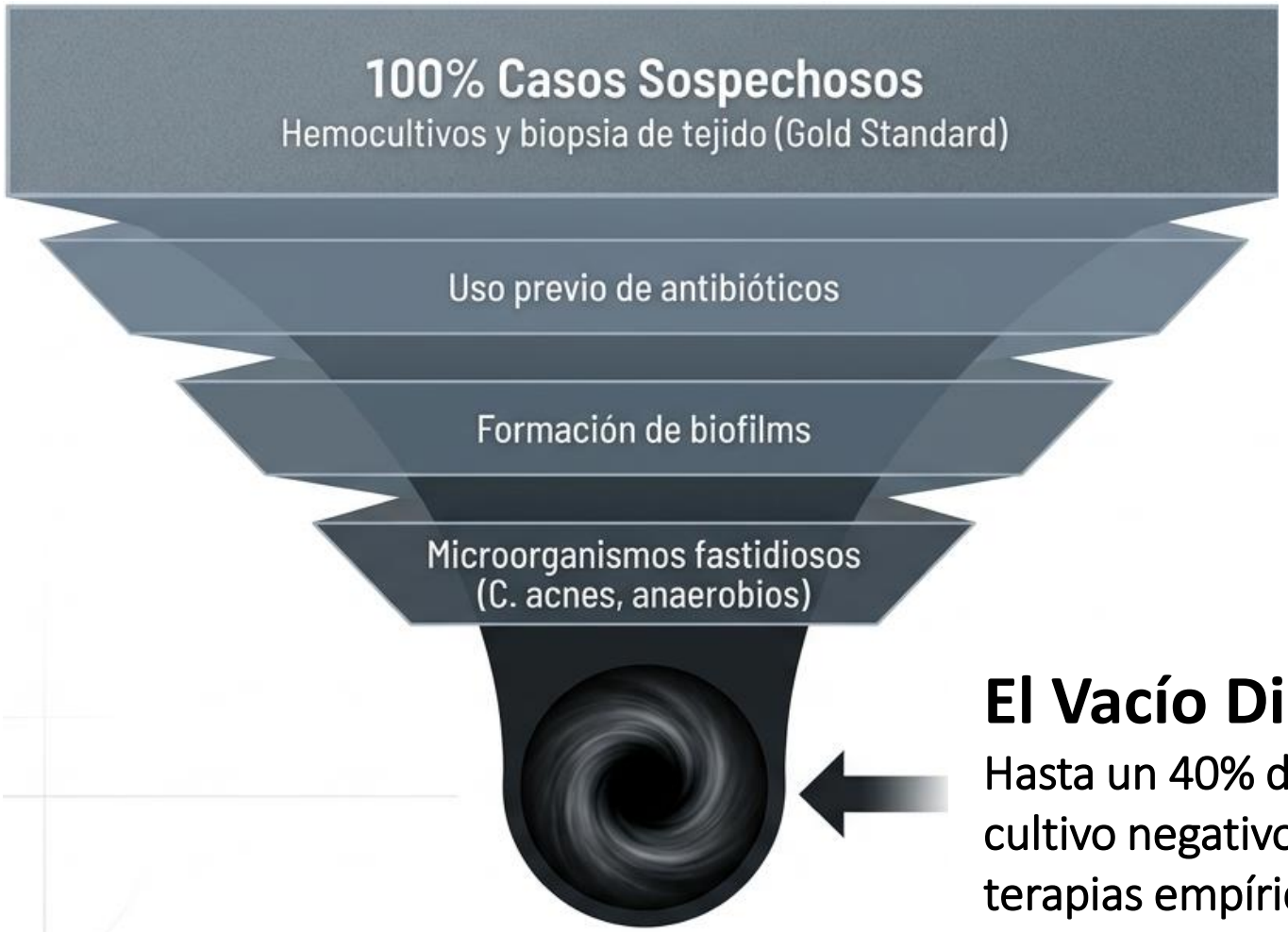
Sensibilidad excepcional del **89-100%** en muestras de tejido espinal.

Impacto Clínico

Detección simultánea de ***M. tuberculosis*** y señales **genéticas de resistencia a la rifampicina**, alterando drásticamente el manejo temprano.

1. Introducción

El Vacío Diagnóstico : Limitaciones del método estándar actual

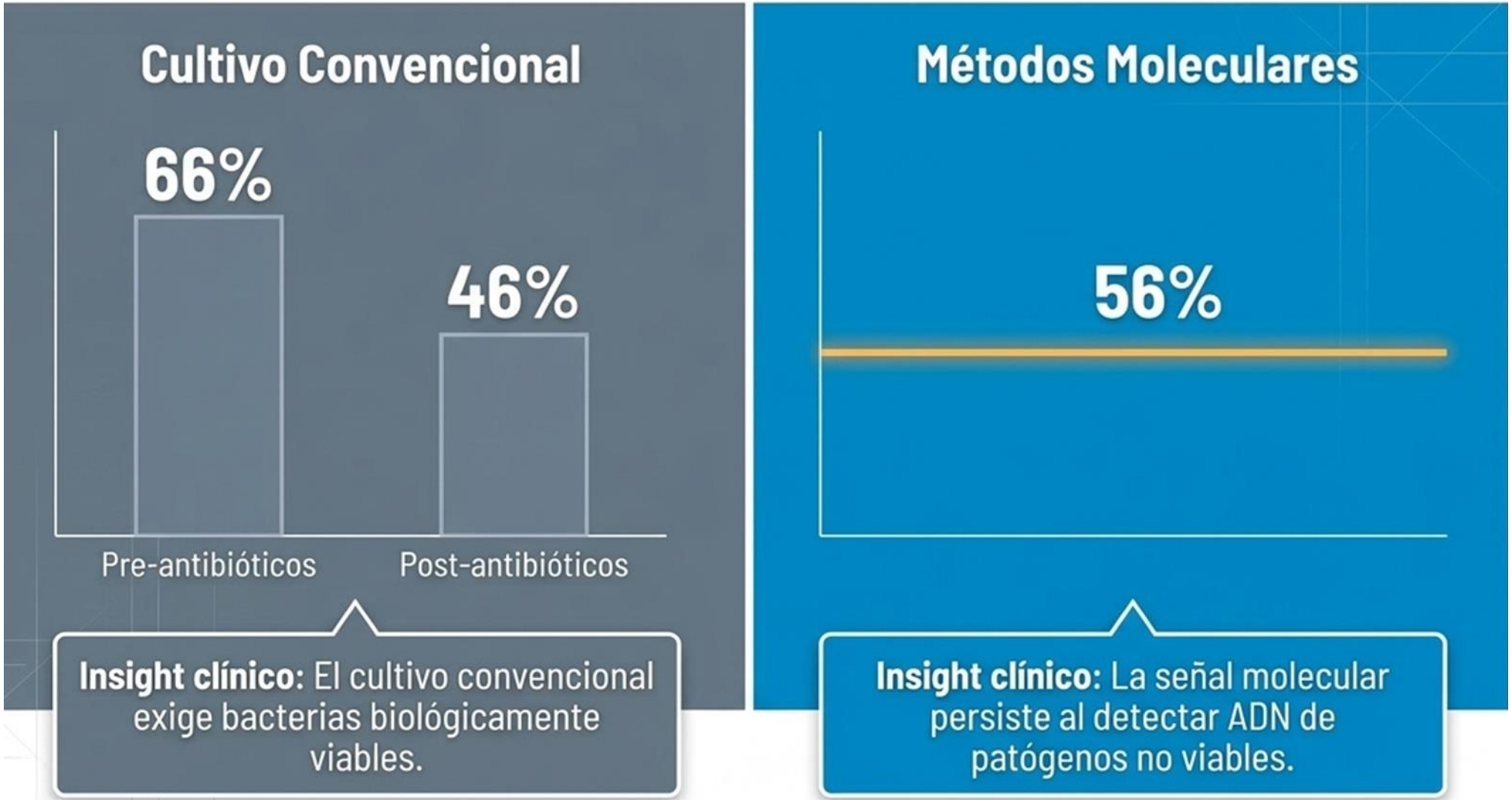


El Vacío Diagnóstico

Hasta un 40% de casos resultan cultivo negativo, obligando a terapias empíricas no dirigidas.

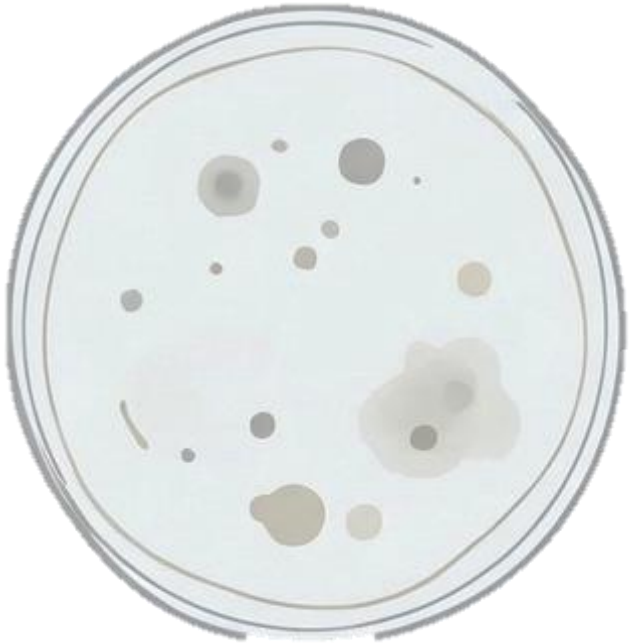
1.Introducción

El impacto de los antibióticos previos: devastador



1. Introducción

Un cambio de paradigma, una herencia de familia





Microbiología convencional

FENOTIPO: m.o. viable, condiciones óptimas, Tº incubación adecuado

Diagnóstico molecular

GENOTIPO: ADN bacteriano directo de la muestra clínica





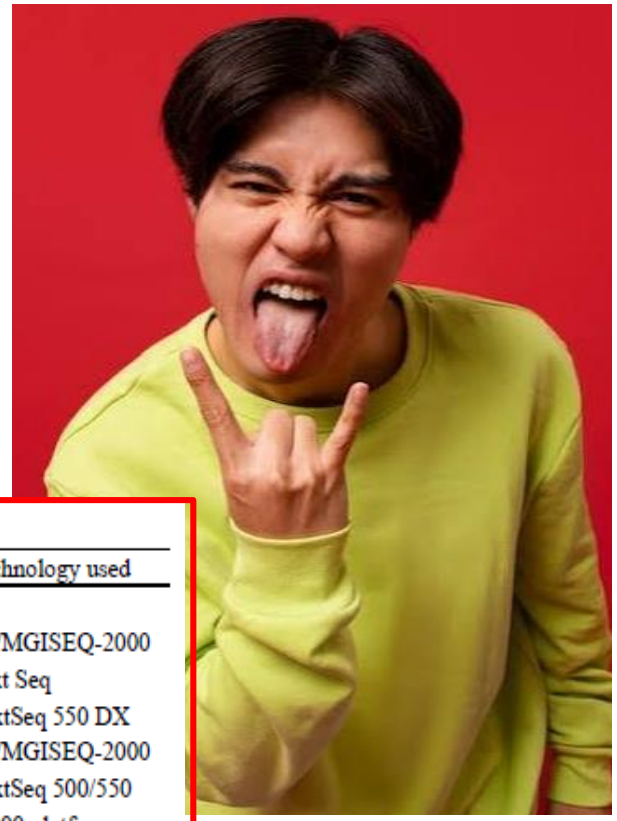


Table 1 Characteristics of the included studies

S. No.	Author	Year	Country	Direction of Study	Platform/Technology used
16.	Chen et al.[16]	2022	China	Prospective	*N*/A
17.	Ma et al. [17]	2022	China	Retrospective	BGISEQ-50/MGISEQ-2000
18.	Zhang et al. [18]	2022	China	Prospective	illumina Next Seq
19.	Xu et al. [19]	2022	China	Retrospective	Illumina NextSeq 550 DX
20.	Wang et al. [20]	2023	China	Retrospective	BGISEQ-50/MGISEQ-2000
21.	Zhang et al. [21]	2023	China	Retrospective	Illumina NextSeq 500/550
22.	Li et al. [22]	2023	China	Prospective	MGISEQ-2000 platform
23.	Wang et al. [23]	2023	China	Prospective	MGISEQ-2000 platform
24.	Zhang et al. [24]	2023	China	Prospective	illumina
25.	Chen et al. [25]	2024	China	Retrospective	illumina Next Seq
26.	Li et al. [26]	2024	China	Retrospective	illumina
27.	Qi et al. [27]	2024	China	Retrospective	PathoXtract®, WillINGMED
28.	Yin et al. [28]	2024	China	Retrospective	N/A
29.	Li et al. [29]	2024	China	Retrospective	N/A
30.	Shi et al. [30]	2025	China	Retrospective	MGISEQ-2000 platform

Secuenciación en Infección Osteoarticular en España
Encuesta 2025-26



Uso diagnóstico 47,6%

81% Infecciones cultivo negativo

Limitaciones

72% limitaciones de coste

72% falta de personal

63% falta de bioinformáticos

Proveedores

95% Illumina

38% Minion





2. Técnicas moleculares: Definiciones

PCR	Descripción General
PCR de amplio espectro (broad range PCR)	detección de genes presentes de forma universal en los mo (requiere una etapa posterior de secuenciación para su ID)
PCR dirigida (targeted PCR)	detección específica de un mo concreto y/o de un mecanismo de resistencia
PCR multiplex (multiplex PCR)	detección simultánea de varios mo y/o mecanismos de resistencia mediante la incorporación de cebadores (primers) de interés

Tecnología	Definiciones
Secuenciación de nueva* generación **(NGS)**	secuenciación de alto rendimiento y masivamente paralela de fragmentos de ADN, realizada de forma independiente y simultánea.
Secuenciación del genoma completo **(WGS)**	método para analizar la totalidad del genoma microbiano
Secuenciación de nueva generación) dirigida **(tNGS)** directamente a partir de la muestra	se centra únicamente en regiones específicas de interés del genoma. Requiere una etapa de preparación del ADN previa a la secuenciación: «enriquecimiento de dianas», en la que las secuencias del ADN objetivo se amplifican o se capturan y, a continuación, se secuencian.
Secuenciación metagenómica de tipo **«shotgun»** mediante NGS directamente a partir de la muestra	se secuencian todos los ácidos nucleicos detectados directamente en las muestras de los pacientes. Permite evaluar la diversidad bacteriana y determinar la abundancia de mo.

Portillo, M.E.; Sancho, I. Advances in the Microbiological Diagnosis of Prosthetic Joint Infections. *Diagnostics 2023*, 13, 809

Tres maneras de buscar ADN con la PCR

La PCR funciona como una fotocopiadora de ADN: hace millones de copias de un fragmento elegido, para poder detectarlo. Los cebadores (primers) son pequeños fragmentos de ADN que marcan dónde empieza y dónde termina la copia.

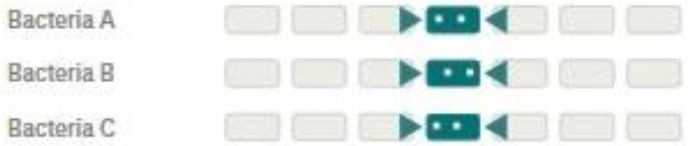


1 PCR de amplio rango

(broad-range PCR)

«Busco una señal común al grupo»

Los cebadores reconocen zonas compartidas por muchas bacterias del grupo (p. ej., el gen 16S) y copian esa misma zona.



Se copia una zona común a todo el grupo
→ su secuencia ayuda a identificar cuál es

2 PCR dirigida

(targeted PCR)

«Busco esta señal concreta»

La diana es el fragmento de ADN que queremos detectar. Los cebadores se diseñan a su medida: solo se copia ese fragmento; si no está, no ocurre nada.



Busca una diana elegida de antemano
→ ideal para confirmar un microorganismo concreto

3 PCR múltiple

(multiplex PCR)

«Busco varias señales a la vez»

En un mismo tubo entran varios pares de cebadores, cada uno con su diana. Una sola reacción responde a varias preguntas a la vez.



Ejemplo: ¿cuáles de estas dianas están presentes?

Jourdan L et al. Molecular Ecology Resources, 2026; 26:e70138

Hassan et al. *J Infect Dev Ctries* 2014; 8(10):1252-1258

Secuenciación de nueva generación: ¿qué es y en qué se diferencia?

Tecnologías que permiten leer el material genético de forma rápida y masiva, con distintas estrategias según el objetivo.

GEIO
GRUPO DE ESTUDIO DE LA INFECCIÓN OSTEOARTICULAR
seimc

NGS
(Next Generation Sequencing)

Es un **término general** que engloba las tecnologías de secuenciación masiva, capaces de leer millones de fragmentos de ADN de forma paralela y rápida.



En resumen

- Tecnología (plataforma).
- Puede aplicarse a distintos fines (genoma completo, regiones diana, metagenómica...).
- Alta capacidad de secuenciación y rapidez.

Coste aproximado por determinación:
200 – 1.000 €
(según plataforma, panel o finalidad)

WGS
(Whole Genome Sequencing)

Consiste en secuenciar **todo el genoma de un organismo** (bacteria, hongo, virus **o humano**). Proporciona una visión completa de su material genético.



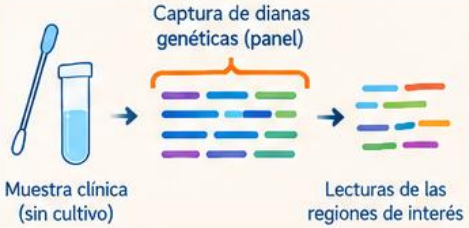
En resumen

- Secuencia todo el genoma.
- Útil para estudiar la variabilidad genética, resistencias, relaciones evolutivas, etc.
- Mayor cantidad de datos y análisis más complejos.

Coste aproximado por determinación:
800 – 2.000 €
(según organismo, profundidad y análisis)

tNGS
(Targeted Next Generation Sequencing) directamente de la muestra

Secuencia **solo los genes o regiones de interés** (por ejemplo, genes de resistencia, de patogenicidad, etc.) directamente desde la muestra clínica, sin necesidad de cultivar el microorganismo.



En resumen

- Dirigido a genes o regiones concretas.
- Se realiza directamente sobre la muestra (sin cultivo).
- Más rápido y sensible para detectar patógenos y resistencias específicas.
- Ideal en infecciones donde se necesita una respuesta rápida.

Coste aproximado por determinación:
300 – 800 €
(según número de genes/panel y plataforma)

Shotgun metagenomic sequencing
directamente de la muestra

Secuencia **todo el material genético presente en la muestra** (ADN y/o ARN) sin dirigirse a un patógeno concreto. Permite identificar múltiples microorganismos (bacterias, virus, hongos, parásitos) y analizar sus genes, incluido los de resistencia.



En resumen

- No se dirige a un objetivo concreto.
- Detecta múltiples microorganismos en una sola prueba.
- Útil en infecciones de origen incierto o complejas (p. ej., sepsis, meningitis, neumonía).
- Requiere análisis bioinformático más avanzado.

Coste aproximado por determinación:
600 – 1.500 €
(según panel, tiempo de análisis y plataforma)

En resumen: todas son tecnologías de secuenciación masiva, pero se diferencian en el **alcance** (general o dirigido), en si se aplican a todo el genoma o a regiones concretas, y en si se realizan sobre cultivo o directamente sobre la muestra. El coste varía según la tecnología, el objetivo y la complejidad del análisis.

Portillo, M.E.; Sancho, I. Advances in the Microbiological Diagnosis of Prosthetic Joint Infections. *Diagnostics 2023*, 13, 809

2. Técnicas moleculares: **PCR 16S** Rendimiento y rol clínico

Mecanismo: Amplifica las regiones conservadas y variables del gen ribosómico 16S.

Superpoder Clínico: Excelente para descartar la ausencia de enfermedad (Rule-in) y para rescatar organismos fastidiosos como *Streptococcus spp.* en casos pre-tratados.

El poder del Rule-In

Su altísima especificidad permite confirmar el diagnóstico bacteriano con absoluta seguridad clínica.



Sensibilidad: 78-80%

Especificidad: 94%

Incremento del rendimiento

Añade un ~4% a los diagnósticos definitivos globales, siendo vital en el subgrupo de cultivos previamente negativos.

Limitaciones: **Tiene baja S en muestras con baja carga bacteriana, dificultad en infecciones polimicrobianas (superposición de cromatogramas) y no proporciona perfiles fenotípicos de susceptibilidad Ab.**

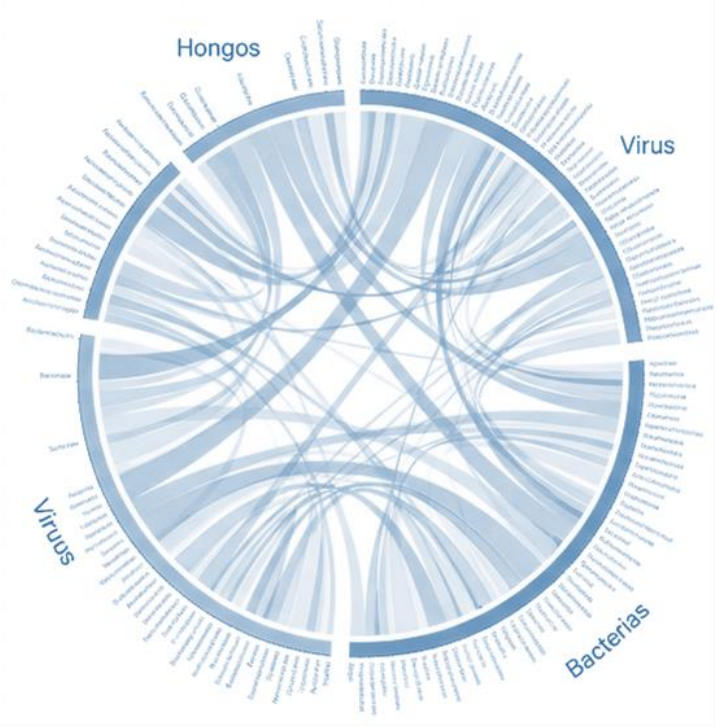
2. Técnicas moleculares: **mNGS** Ampliando el espectro

Principal Diferencia

No requiere primers predefinidos. Secuenciación profunda de todo el material ADN/ARN presente en la muestra de tejido (unbiased)

Superpoder Clínico

Descubrimiento de lo atípico. Detecta *M. tbc, Brucella, Aspergillus* y otros mo raros en una sola prueba



Limitaciones: Menor especificidad frente al cultivo único (detección de ADN de ruido/contaminación de piel como *C. acnes*), alto coste económico y necesidad de interpretación bioinformática especializada.

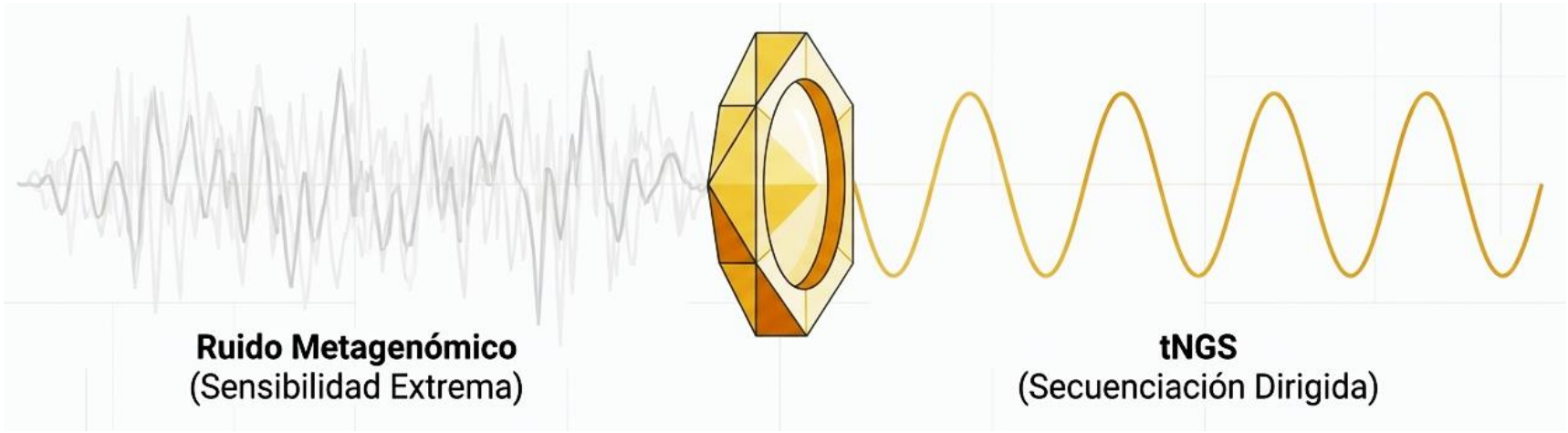
Sensibilidad: 82-91%
(vs. 30,8% del cultivo)

Especificidad: 71%
(Sensible al ADN de fondo humano)

Métricas de rendimiento:

- La sensibilidad global se eleva al ~82%.
- Identifica un patógeno potencial en >65% de las infecciones vertebrales con cultivo negativo.

2. Técnicas moleculares: **mNGS**



La solución de rescate: tNGS

Utiliza paneles predefinidos para filtrar el ruido. Es la herramienta ideal para buscar genes específicos de resistencia o aislar patógenos raros y escurridizos (Brucella, Coxiella burnetii).

tNGS: Alternativa con mayor especificidad (97%) y menor interferencia de ADN humano.

- DNA 16 S bacterias
- ITS1/ITS2 hongos
- Tb parásitos

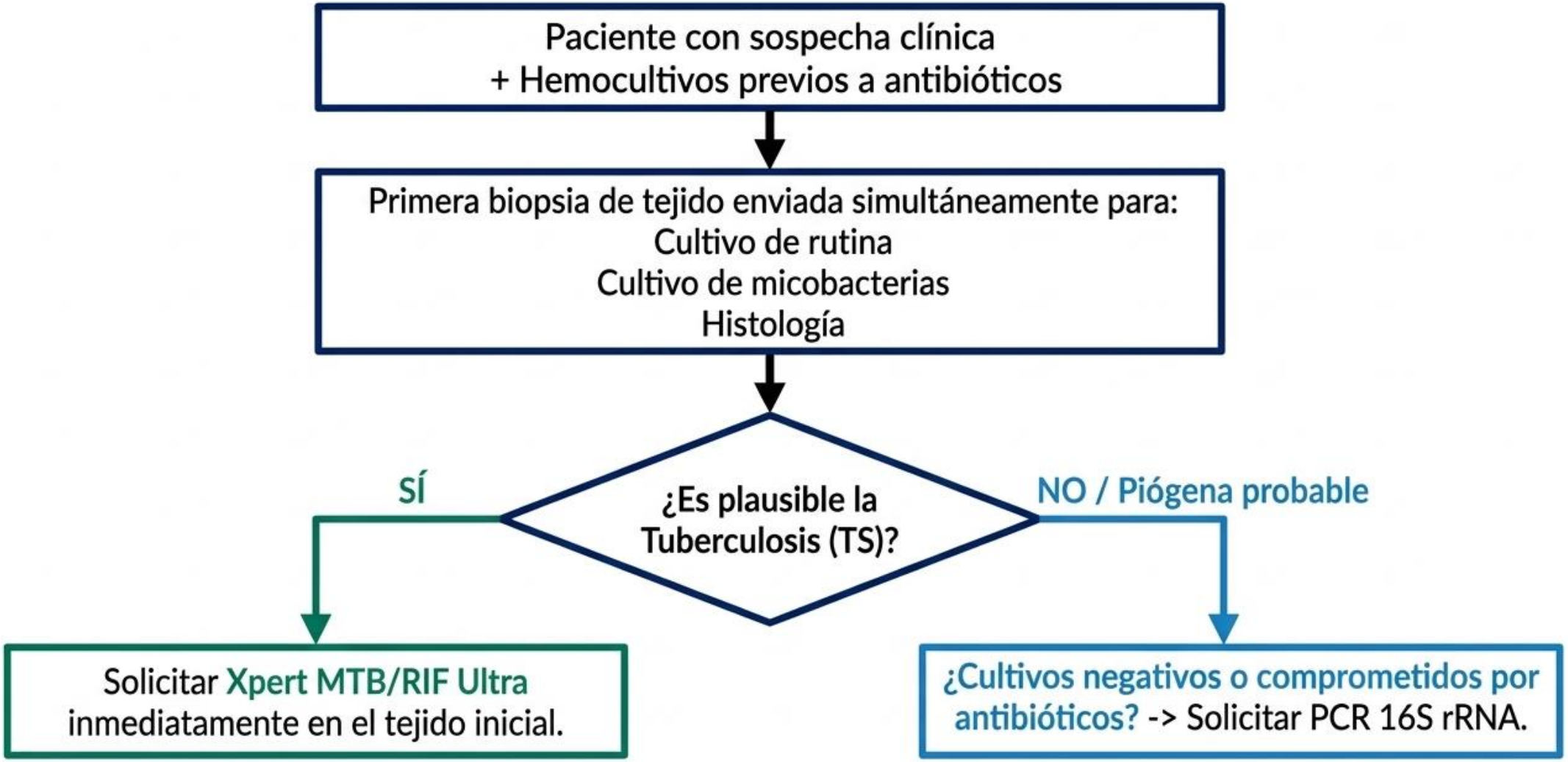
3. Ventajas e inconvenientes: **Coste**

- **Costo por prueba de mNGS**: En estudios clínicos coste de 1 prueba **600 USD (aproximadamente 500 euros)** por muestra.
- **Factores del costo de la mNGS**:
  1. **Reactivos** de secuenciación
  2. I**nfraestructura tecnológica requerida**,
     - la alta carga de almacenamiento de datos y
     - la necesidad de **personal y análisis bioinformático especializado**

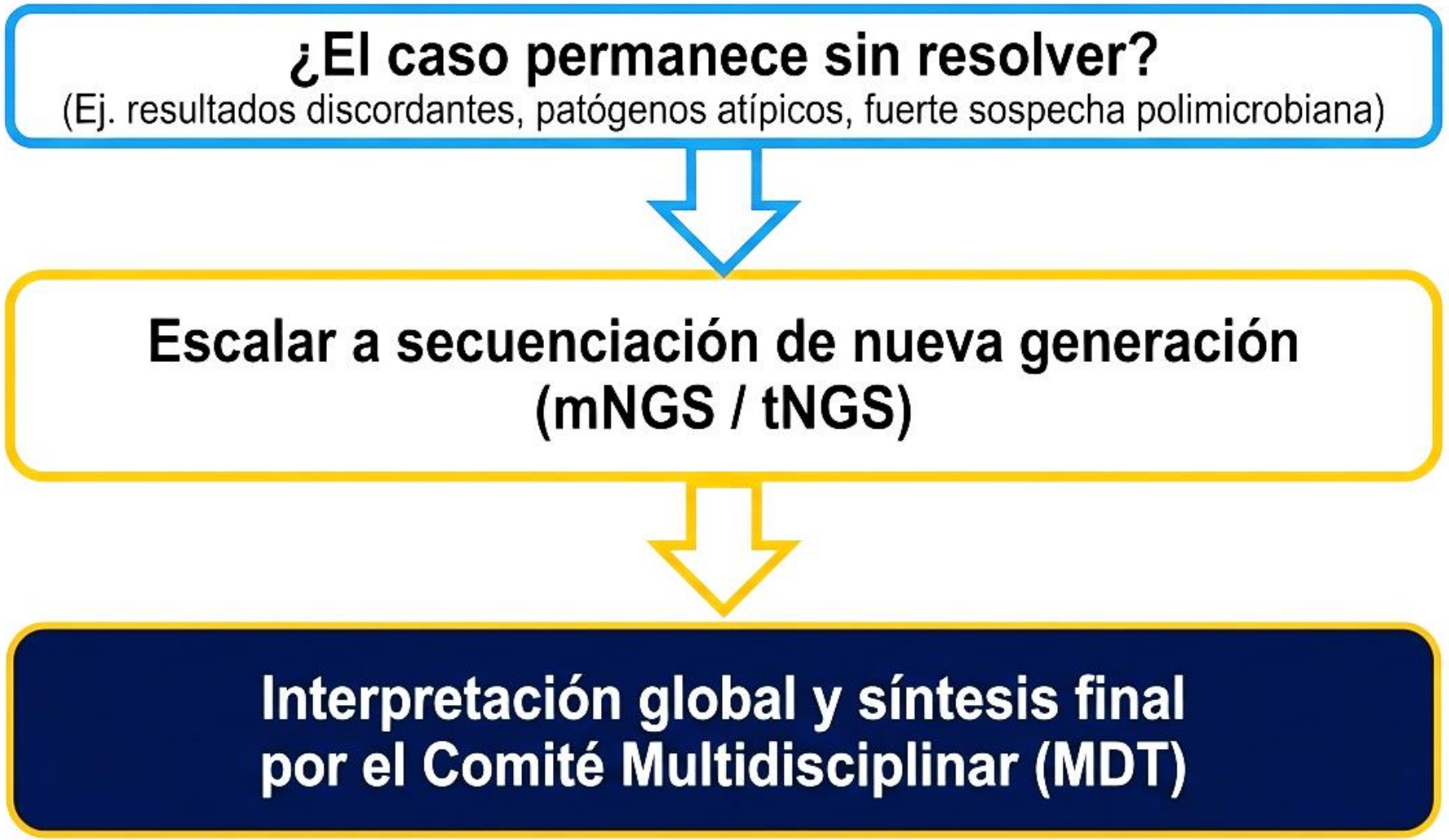


- **Ventaja económica de la PCR**: La PCR dirigida (como paneles sindrómicos) o la PCR 16S con flujos de trabajo simplificados y cerrados que no requieren el análisis masivo de datos ni la bioinformática compleja (120-200 euros/prueba)
- **Estrategia de escalado diagnóstico (*Tiered Approach*)**: Debido a esta brecha de costos, las guías consensuadas recomiendan no utilizar la mNGS como prueba inicial de rutina, sino emplear un **algoritmo escalonado**:

Algoritmo de Escalado Diagnóstico – Fase 1: Primera línea



Algoritmo de Escalado Diagnóstico – Fase 2: Vía de rescate



Matriz de Decisión Diagnóstica

	Cultivo Tradicional	PCR 16S Universal	mNGS (Metagenómica)
Sensibilidad (Con ATB previo)	Muy Baja	Alta	Muy Alta
Especificidad (Falsos Positivos)	Casi 100%	94%	Moderada ~71%
Detección Fúngica / Micobacterias	Requiere cultivo especial	Solo bacterias	Sí, simultáneo
Perfil de Resistencia (Antibiograma)	Sí (Gold Standard)	No	Parcial (Genes de resistencia)
Costo Relativo	Bajo	Medio	Alto

3. Ventajas e inconvenientes: Velocidad de respuesta



Un diagnóstico molecular permite el desescalamiento temprano o la rotación a terapias dirigidas días antes que el cultivo

84,3%

De los casos con diagnóstico mNGS derivaron en una modificación directa del plan de tratamiento Ab

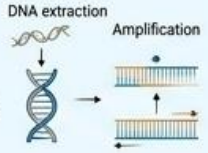
Choudhary S, et al. The role of metagenomic next-generation sequencing in spinal infections: a systematic review and meta-analysis. ***Eur Spine J. 2026***;*35*(12):4172–4180

3. Ventajas e inconvenientes: Cuando la rutina fracasa o tarda en responder

El Paciente Pre-Tratado (PCR 16S)

Contexto:
Paciente transferido, 10 días de antibióticos empíricos. Hemocultivo y punción estériles.

Intervención:
PCR 16S de tejido congelado.



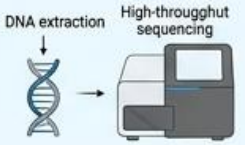
Resultado:
Positivo para *Streptococcus spp.* (patógeno fastidioso común en fallos de cultivo).

Impacto:
Terapia dirigida inmediata y alta hospitalaria temprana.

El Sospechoso Atípico (mNGS)

Contexto:
Cultivo negativo. Biopsia inespecífica. Sospecha persistente de tumor o infección crónica.

Intervención:
Secuenciación mNGS del tejido biopsiado.



Resultado:
Detección directa de *Mycobacterium tuberculosis*.

Impacto:
Inicio de terapia cuádruple precoz sin esperar 8 semanas al cultivo en medios sólidos.

Both A, et al. The added value of a commercial 16S/18S-PCR assay (UMD-SelectNA, Molzym) for microbiological diagnosis of spondylodiscitis: an observational study. ***Diagn Microbiol Infect Dis. 2023***;106(3):115926

¿Es el fin del cultivo tradicional en espondilodiscitis?

El Límite Molecular

La PCR 16S y el mNGS detectan secuencias de ADN, pero no determinan si la bacteria está metabólicamente activa ni cómo responderá a todos los fármacos.



El Poder del Fenotipo

Solo aislar la cepa viva en cultivo permite realizar un antibiograma completo (CMI) para confirmar la susceptibilidad exacta.

La verdadera innovación es la complementariedad.
El genotipo identifica; el fenotipo guía el arma.

Límites de Resolución: Lo que debemos conocer



El Ruido de Fondo (Falsos Positivos)

Especialmente en mNGS, la detección de ADN de flora cutánea (ej. *C. acnes*) o contaminación de reactivos requiere interpretación clínica rigurosa. La alta sensibilidad captura espectadores.



Resistencia Incompleta

El mNGS puede detectar ciertos genes de resistencia (ej. *mecA* para MRSA), pero predecir el predecir el perfil completo de susceptibilidad a partir del genoma aún está en fase experimental.



Barreras de Acceso

El mNGS tiene un costo elevado y requiere bioinformática avanzada, avanzada, limitándolo temporalmente a centros de tercer nivel o pruebas externalizadas.

Gemini Notebook

El Nuevo Flujograma Diagnóstico (Fase de Adquisición)

Sospecha de Espondilodiscitis Nativa + Indicación de Biopsia

HEMOCULTIVOS

Extracción de Muestra de Tejido/Disco en Quirófano

50% de la muestra en fresco

Enviar inmediatamente para Cultivo Tradicional e Histopatología.

50% de la muestra preservada

Congelar en seco a -80°C o usar medio de transporte molecular.

Regla de Oro: Nunca consumir toda la muestra en medios de cultivo. El rescate molecular requiere preservación de ADN intacto desde el día cero.

El Enfoque Escalonado (Integración Clínica)

¿El paciente recibió antibióticos empíricos previos?

Activar **Secuenciación** mNGS o PCR 16S Inmediatamente.

Esperar **Cultivo Convencional** (Días 0 a 3).

¿Cultivos o empeoramiento

¿Cultivos estériles clínico al Día 3?

Descongelar muestra de reserva y activar Biología Molecular.

Uso racional de recursos: Las pruebas moleculares actúan como salvavidas diagnósticos cuando la vía estándar falla.

El Imperativo del Equipo Multidisciplinar (MDT)

Calidad del espécimen y cultivos previos

Serologías

Hallazgos histopatológicos



Correlación de imagen (RM/TC)

Biomarcadores

Probabilidad pre-test del paciente

MOLECULAR

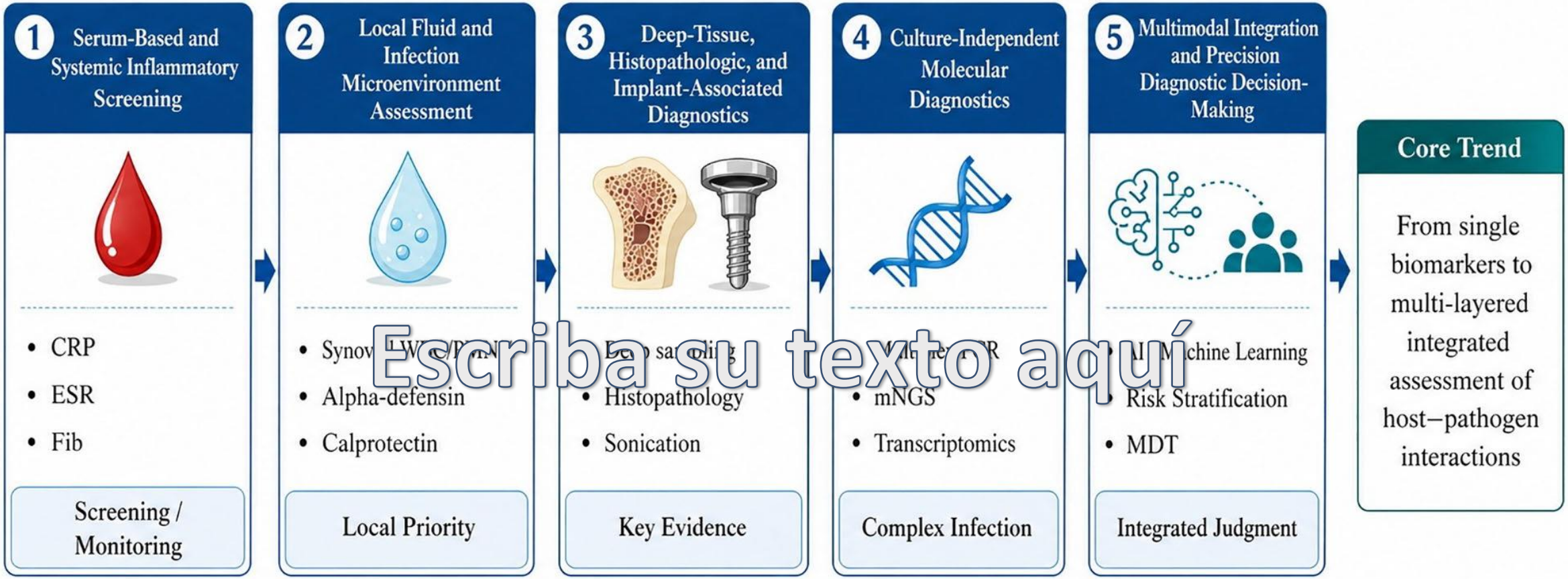
Mensaje Central: Las pruebas moleculares no reemplazan al cultivo ni a la anatomía patológica; las aumentan. El MDT es esencial para distinguir la verdadera infección de la colonización o el ruido biológico.

Conclusiones

1. **Asegura el diagnóstico**
   - Congela una fracción de la biopsia como póliza si falla el cultivo
2. **PCR16S confirma, mNGS descubre**
   - Alta especificidad para patógenos pretratados
   - Acude al mNGS para patógenos inusuales
3. **Diagnóstico multimodal**
   - El cultivo no desaparece, se sinergiza con los datos del genotipo
   - El abordaje multidisciplinar ayuda a interpretar resultados complejos



Conclusiones



Escriba su texto aquí

Las técnicas moleculares han transformado el diagnóstico etiológico de la espondilodiscitis y la osteomielitis vertebral, especialmente en escenarios donde los cultivos convencionales fallan (que ocurre hasta en un 30-50% de los casos).

¡GRACIAS!

Referencias

1. Both A, Christner M, Berinson B, et al. The added value of a commercial 16S/18S-PCR assay (UMD-SelectNA, Molzym) for microbiological diagnosis of spondylodiscitis: an observational study. **Diagn Microbiol Infect Dis. 2023**;106(3):115926. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2023.115926.
2. Chen J, Liu Y, Huang S, et al. Spinal Infections? mNGS Combined with Microculture and Pathology for Answers. **Infect Drug Resist. 2024**;17:3025–3034. doi:10.2147/IDR.S466738.
3. Choi SH, Sung H, Kim SH, et al. Usefulness of a direct 16S rRNA gene PCR assay of percutaneous biopsies or aspirates for etiological diagnosis of vertebral osteomyelitis. **Diagn Microbiol Infect Dis. 2014**;78(1):75–78. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.10.007.
4. Choudhary S, Kanaujia R, Bahadur R, Angrup A. The role of metagenomic next-generation sequencing in spinal infections: a systematic review and meta-analysis. **Eur Spine J. 2026**;35(12):4172–4180. doi:10.1007/s00586-026-09805-4.
5 Li J, Lian S, Liu Y, et al. From serum inflammatory markers to fluid, tissue, and molecular assays: current advances in the laboratory diagnosis of bone and joint infections. **Front Cell Infect Microbiol. 2026**;16:1865643. doi:10.3389/fcimb.2026.1865643.
6. Ma C, Wu H, Chen G, Liang C, Wu L, Xiao Y. The potential of metagenomic next-generation sequencing in diagnosis of spinal infection: a retrospective study. **Eur Spine J. 2022**;31(2):442–447. doi:10.1007/s00586-021-07026-5.
7. Mahmoud OK, Petri F, El Zein S, et al. What Is the Accuracy of 16S PCR Followed by Sanger Sequencing or Next-generation Sequencing in Native Vertebral Osteomyelitis? A Systematic Review and Meta-analysis. **Clin Orthop Relat Res. 2025**;483(5):930–938. doi:10.1097/CORR.0000000000003314.
8. Marian A, Vanța OM, Danci V, et al. Differentiating Tuberculous and Pyogenic Spondylodiscitis: Part I—Epidemiology, Clinical Features, Laboratory Markers, and Tissue-Based Diagnosis. **Diagnostics. 2026**;16(14):2243. doi:10.3390/diagnostics16142243.
9. Olearo F, El Zein S, Portillo ME, et al. Diagnostic accuracy of 16S rDNA PCR, multiplex PCR and metagenomic next-generation sequencing in periprosthetic joint infections: a systematic review and meta-analysis. **Clin Microbiol Infect. 2025**;31(7):1115–1125. doi:10.1016/j.cmi.2025.02.022.
10. Saeed K, Esposito S, Ascione T, et al. Hot topics on vertebral osteomyelitis from the International Society of Antimicrobial Chemotherapy. **Int J Antimicrob Agents. 2019**;54(2):125–133. doi:10.1016/j.ijantimicag.2019.06.007.

Guías y Estudios Complementarios

1. Berbari EF, Kanj SS, Kowalski TJ, et al. 2015 Infectious Diseases Society of America (IDSA) Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Native Vertebral Osteomyelitis in Adults. **Clin Infect Dis. 2015**;61(6):e26–e46. doi:10.1093/cid/civ482.
2. Lacasse M, Derolez S, Bonnet E, et al. 2022 SPILF—Clinical Practice guidelines for the diagnosis and treatment of disco-vertebral infection in adults. **Infect Dis Now. 2023**;53(3):104647. doi:10.1016/j.idnow.2023.104647.
3. Waters R, Laubscher M, Dunn RN, et al. Higher Sensitivity of Xpert MTB/RIF Ultra Over Tuberculosis Culture for the Diagnosis of Spinal Tuberculosis With Open or Computed Tomography-Guided Biopsies. **Open Forum Infect Dis. 2024**;11(1):ofad621. doi:10.1093/ofid/ofad621.