

METAGENÓMICA CLÍNICA TRASLACIONAL

DISRUPCIÓN DEL CULTIVO MICROBIOLÓGICO
MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE NANOPOROS Y
DIAGNÓSTICO MOLECULAR DIRECTO



Deyaneira Dayana Cevallos Arteaga

ISBN: 978-9907-818-61-1





Metagenómica Clínica Traslacional

Disrupción del Cultivo Microbiológico mediante Secuenciación de Nanoporos y Diagnóstico Molecular Directo.

Autores:

Deyaneira Dayana Cevallos Arteaga

Código ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3661-0022>

Correo electrónico institucional: deyaneira.cevallos@upec.edu.ec

Filiación institucional: Universidad Politécnica Estatal del Carchi

Editorial “ACACFESA SAS”

La presente obra fue revisada por 2 pares académicos externos ciegos conforme al proceso editorial de ACACFESA SAS.

Los rigurosos procedimientos editoriales de ACACFESA SAS garantizan la selección de manuscritos por sus aportes significativos al conocimiento y cualidades científicas.

Editorial: ACACFESA SAS.

Sello editorial: 978-9907-818

Teléfono: (+593) 998955446

Web: <https://acacfesa.com/editorial/index.php/1>

ISBN: 978-9907-818-61-1

Doi: <https://doi.org/10.70577/1drdmb17/ACACFESA.EDITORIAL>

Año: Septiembre 2026

Aviso Legal

El contenido de esta obra, que incluye ilustraciones, textos, tablas, gráficos, cuadros y referencias bibliográficas, es responsabilidad única del autor o autores. Lo que se ha dicho, los criterios y los datos no reflejan necesariamente la posición institucional ni el pensamiento de la Editorial ACACFESA SAS.

Derechos de Autor ©

Este documento se publica conforme los términos y condiciones de la EDITORIAL ACACFESA SAS

Esta obra está bajo una licencia internacional



Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0

La "Editorial ACACFESA SAS " y todos sus autores tienen la propiedad única de los derechos de autor y de propiedad intelectual e industrial relacionados con el contenido de esta publicación. La reproducción total o parcial de esta obra, su almacenamiento en sistemas informáticos, su tratamiento digital y cualquier tipo de distribución, transmisión o comunicación pública por medios electrónicos, ópticos, mecánicos, químicos, fotográficos o de grabación están prohibidos. Esto se encuentra bajo las sanciones que establece la legislación vigente a menos que se cuente con la autorización previa y por escrito de los titulares del copyright.

Queda excluido únicamente el uso con fines académicos o de investigación científica, siempre que no busque objetivos comerciales y se ejecute sin remuneración, debiendo mencionarse en todo momento a la fuente editorial correspondiente. Los autores son los únicos responsables de las opiniones expresadas en los diferentes capítulos, las cuales no necesariamente representan el punto de vista institucional de la editorial.

Constancia de Arbitraje

La Editorial ACACFESA SAS, certifica que este libro es el resultado de un estudio llevado a cabo por los autores, el cual fue evaluado por jurados expertos bajo el sistema de Pares Externos, tanto en contenido como en forma. Asimismo, se llevó a cabo un análisis del método de investigación, paradigma y enfoque; a partir de la matriz epistémica adoptada por los autores, utilizando las normas APA, Séptima Edición y el proceso de antiplagio en línea turniting para asegurar que la obra fuera científica.

Revisor par externo 1

Lema Balla Juan Carlos

Revisor par externo 2

Diego Hernán Gómez Miranda

Prólogo

La microbiología clínica está experimentando una transformación significativa gracias a las tecnologías emergentes que permiten la evaluación directa del material genético de los microorganismos en las muestras de pacientes. Durante muchos años, el diagnóstico de infecciones se ha fundamentado principalmente en el cultivo microbiológico, que ha sido una herramienta fundamental para reconocer agentes patógenos y seleccionar el tratamiento más adecuado. A pesar de, en el enfoque presenta limitaciones, como el prolongado tiempo necesario para el crecimiento, la solicitud de condiciones específicas para el cultivo y la dificultad para recuperar ciertos microorganismos.

En donde se ha impulsado la búsqueda de métodos alternativos que proporcionen información más rápida, exhaustiva y precisa. En donde el marco, la metagenómica clínica traslacional emerge como una alternativa que integra los avances en biología molecular, bioinformática y atención médica, ofreciendo un enfoque novedoso para el diagnóstico de infecciones: la identificación directa de las huellas genéticas de los microorganismos en las muestras de los pacientes.

La secuenciación mediante tecnología de nanoporos es una de las herramientas que está impulsando donde el cambio, debido a su capacidad de analizar rápidamente fragmentos de ADN y ARN, generando datos genéticos que pueden ser interpretados en tiempo real. A diferencia de los métodos convencionales, el diagnóstico molecular directo no requiere que el microorganismo sea cultivable, lo que expande las oportunidades para identificar agentes infecciosos que podrían no ser detectados por técnicas tradicionales. Esta habilidad es especialmente vital en contextos clínicos donde el tiempo es un factor crítico, ya que la rápida identificación del agente causante puede facilitar decisiones terapéuticas, disminuir tratamientos empíricos innecesarios y promover un uso más eficiente de los recursos.

La metagenómica clínica no se limita a sustituir una técnica por otra, sino que busca revolucionar nuestra comprensión y enfoque hacia el diagnóstico microbiológico. A través del análisis conjunto del material genético de una muestra, tenemos la oportunidad de investigar comunidades microbianas complejas, descubrir microorganismos sorprendentes y obtener datos cruciales sobre genes de resistencia a antimicrobianos, así como otros aspectos esenciales para la interpretación clínica.

Entre el enfoque renovado es especialmente valioso en casos de infecciones de origen desconocido, infecciones causadas por múltiples microorganismos o cuando los métodos

convencionales no logran proporcionar un diagnóstico adecuado. Así, el laboratorio se transforma de un simple lugar de cultivo de microorganismos a un entorno más interactivo, enfocado en la lectura y análisis de información molecular. A pesar de, el verdadero potencial de esta evolución reside en su habilidad para adaptar los resultados tecnológicos a las necesidades específicas de los pacientes.

La integración de la secuenciación de nanoporos en el diagnóstico clínico exige una combinación de criterios microbiológicos, moleculares, bioinformáticos y clínicos, además de aspectos como la calidad de la muestra, la posible contaminación, la interpretación de resultados y la existencia de infraestructura especializada. Por ello, la metagenómica clínica traslacional debe considerarse un proceso de integración, en lugar de simplemente la adopción de una nueva tecnología. Su valor real se manifiesta en la conversión de la información genética recogida de una muestra en conocimiento clínicamente relevante y oportuno, que apoye decisiones bien fundamentadas.

El avance de pasar de observar microorganismos mediante su crecimiento a identificar su material genético de forma directa constituye un cambio importante, tanto en términos tecnológicos como conceptuales. Esta progresión no solo permite diagnósticos más rápidos y completos, adaptados a la complejidad microbiana de cada paciente, sino que también introduce nuevos desafíos relacionados con la interpretación de datos, la estandarización de procedimientos y su integración efectiva en los servicios de salud.

En conclusión, la metagenómica clínica traslacional representa una microbiología que evoluciona de la espera a la previsión, del aislamiento de microorganismos a la interpretación de comunidades genéticas, y de un diagnóstico que sólo se basa en cultivos a una comprensión más profunda de las infecciones a nivel molecular. En donde la secuenciación de nanoporos y el diagnóstico molecular directo se han convertido en herramientas esenciales para proporcionar respuestas diagnósticas más rápidas y precisas.

El verdadero reto ya no consiste únicamente en desarrollar tecnologías que generen grandes cantidades de información, sino en aprender a convertir esa información en decisiones clínicas que realmente beneficien al paciente y fortalezcan la capacidad de la microbiología para abordar las infecciones tanto actuales como futuras.

Tabla de contenido

Prólogo.....	v
CAPÍTULO I	1
Biofísica de la Translocación de Ácidos Nucleicos en Nanoporos de Proteína	1
1.1. Dinámica de la corriente iónica a través de poros de α -hemolisina y MspA.....	3
1.2. Cinética de la helicasa y control de la velocidad de translocación de bases.....	4
1.3. Biofísica de las lecturas ultra-largas (Ultra-long reads) y su rol en el ensamblaje de novo	8
1.4. Química de motores enzimáticos y estabilidad de la señal eléctrica en condiciones de flujo	10
1.4.1. Detección directa de modificaciones epigenéticas sin conversión de bisulfito .	11
1.4.2. Mecánica de la captura de fragmentos en bibliotecas de baja biomasa.....	12
1.5. Optimización de la relación señal-ruido en dispositivos de detección portátil.....	13
1.6. Influencia del plegamiento secundario del ARN en la secuenciación directa (Direct-RNA seq).....	14
1.6.1. La influencia en la rapidez de la translocación.....	15
1.6.2. Influencia sobre la helicasa.....	16
1.7. Evolución de la selectividad del poro	16
1.8. Arquitectura de sensores CMOS y escalabilidad de la lectura masiva	17
1.8.1. Controversias actuales, análisis crítico de la evidencia y perspectivas futuras .	19
1.8.2.. El dilema biofísico de la precisión y el error estocástico.....	19
1.8.3. Controversias en la interpretación metagenómica: El "Kit-oma" y el ADN ambiental	20
1.8.4. Análisis crítico de la evidencia: Impacto clínico frente a rendimiento técnico	20
1.8.5. Perspectivas futuras: Hacia la proteómica de nanoporos y la medicina personalizada	21

Capítulo II	22
Preparación de Muestras y Estrategias Críticas de Deplesión del ADN del Huésped	22
2.1. Cinética de lisis diferencial: Preservación de la integridad fúngica y bacteriana	23
2.2. Mecanismos de deplesión enzimática mediante nucleasas activadas por saponina	26
2.3. Uso de CRISPR-Cas9 para la eliminación dirigida de secuencias de ADN humano ...	27
2.4. Enriquecimiento mediante sondas de captura híbrida para patógenos emergentes	28
2.5. Protocolos de extracción "Ultra-Low Input" para muestras de sitios estériles	29
2.6. Impacto de la fragmentación mecánica en la continuidad del ensamblaje metagenómico	30
2.7. Inhibidores de la polimerasa en matrices complejas: Sangre, LCR y líquido sinovial.	31
2.8. Estandarización de controles internos negativos y el problema del "kit-oma"	32
2.8.1. Automatización robótica en la preparación de librerías para diagnóstico point-of-care	33
2.8.2. Validación de métodos de purificación de ARN para transcriptómica dual	34
Capítulo III	36
Taxonomía Agnóstica y la Disrupción del Dogma del Cultivo Microbiológico	36
3.1. Límites de la sensibilidad analítica: mNGS frente a la amplificación por PCR multicanal	36
3.1.1. El microbioma de la sangre	37
3.1.2. Identificación de patógenos no cultivables y virus emergentes en nichos críticos	38
3.2. Cuantificación absoluta de carga viral y bacteriana mediante profundidad de lectura.	40
3.3. Sesgos de representación genómica en bases de datos taxonómicas actuales	41
3.4. Detección de coinfecciones complejas en el paciente crítico	41
3.5. Microbiota comensal vs. invasión patogénica: Definición de umbrales diagnósticos..	42
3.5.1. El papel de la metagenómica en la redefinición de los postulados de Koch	46
3.5.2. Detección de parásitos y microeucariotas mediante secuenciación de lectura larga	47

3.6. Integración de datos morfológicos clásicos con el fenotipado genómico.....	48
3.7. Controversias actuales, análisis crítico de la evidencia y perspectivas futuras	49
Capítulo IV.....	51
Basecalling de Alta Fidelidad y Procesamiento de Señal mediante Redes Neuronales	51
4.1. Arquitecturas de redes neuronales recurrentes para la traducción de corriente a bases	51
4.2. Modelos de aprendizaje profundo para la corrección de errores en homopolímeros ...	52
4.3. Bioinformática de la identificación taxonómica y procesamiento de datos en el punto de atención	55
4.3.1. Inferencia computacional en dispositivos locales (Edge Computing) frente a la nube	58
4.3.2. Algoritmos de alineamiento k-mer de alta velocidad para identificación taxonómica	59
4.3.3. Uso de MinHash y bocetos genómicos para la comparación rápida de metagenomas	60
4.4. Filtrado en tiempo real de lecturas del huésped mediante <i>Read-until</i>	60
4.5. Optimización del flujo de datos en arquitecturas de cómputo GPU	62
4.5.1. Integración de modelos de lenguaje para la anotación funcional de secuencias ..	63
4.5.2. Métricas de calidad de lectura (Q-score) y su impacto en la confianza diagnóstica	64
4.5.3. Estandarización de formatos FAST5 y POD5 en el ecosistema bioinformático....	65
4.6. Controversias actuales, análisis crítico de la evidencia y perspectivas futuras	65
Capítulo V	67
Resistómica Estructural: Predicción de Fenotipo de Resistencia desde el Genotipo	67
5.1. Mapeo de determinantes de resistencia mediante alineamiento con bases de datos curadas (CARD/ResFinder).....	67
5.2. Identificación de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) asociados a resistencia a quinolonas	68

5.3. Detección de elementos genéticos móviles y plásmidos de resistencia en lecturas largas	69
5.4. Predicción del CMI (Concentración Inhibitoria Mínima) mediante modelos de Machine Learning	70
5.5. Análisis del resistoma "oculto" y genes de resistencia de baja expresión	71
5.6. Detección de heteroresistencia en poblaciones bacterianas heterogéneas	72
5.6.1. Identificación de bombas de eflujo y mutaciones en porinas mediante NGS.....	75
5.6.2. Validación de la concordancia genotipo-fenotipo en Gram negativos multirresistentes	76
5.7. Sistemas de alerta temprana ante la detección de carbapenemasas emergentes	76
5.7.1. Controversias actuales, análisis crítico de la evidencia y perspectivas futuras	79
Capítulo VI.....	81
Transcriptómica Dual y Análisis de la Respuesta Inmune del Huésped.....	81
6.1. Análisis simultáneo del transcriptoma del patógeno y del paciente	81
6.2. Firmas de expresión génica del huésped para diferenciar etiología viral vs. bacteriana	82
6.3. Dinámica de la tormenta de citoquinas evaluada mediante RNA-seq directo.....	83
6.4. Marcadores de agotamiento de células T en infecciones crónicas analizados por mNGS	86
6.5. Identificación de biomarcadores de sepsis temprana en el perfil de ARNm leucocitario	87
6.5.1. Mecanismos de evasión inmune bacteriana detectables en el transcriptoma	88
6.5.2. Integración de datos de citoquinas plasmáticas con carga genómica microbiana	88
6.6. Modelado predictivo de fallo orgánico basado en la respuesta inmune molecular	90
6.7. Respuesta inmunitaria específica de órgano: Diferencias entre neumonía y meningitis	91
6.8. Uso de la transcriptómica para monitorizar la eficacia de la terapia inmunomodulador	92

6.8.1. Controversias actuales, análisis crítico de la evidencia y perspectivas futuras	93
Capítulo VII	95
Diagnóstico Metagenómico de Sepsis y Choque Séptico.....	95
7.1. Reducción del tiempo al resultado (Time-to-Result) en la sepsis de origen desconocido	95
7.2. Impacto de la mNGS en la desescalada temprana de antibióticos en la UCI	97
7.3. Diagnóstico de endocarditis con cultivo negativo mediante secuenciación de válvulas	99
7.3.1. Monitorización de la dinámica del patógeno durante la terapia antimicrobiana ...	99
7.4. Diferenciación entre translocación bacteriana y sepsis verdadera.....	100
7.4.1. Integración de procalcitonina y lactato con el conteo de lecturas metagenómicas	103
7.4.2. Implementación de la mNGS en el flujo de trabajo del servicio de urgencias	104
7.5. Coste-efectividad de la metagenómica en la reducción de la estancia hospitalaria....	105
7.6. Sepsis fúngica: Ventajas de la mNGS en la detección de <i>Candida auris</i> y mohos	106
7.7. Controversias actuales, análisis crítico de la evidencia y perspectivas futuras	107
Capítulo VII	109
Neuro-Metagenómica: Infecciones del Sistema Nervioso Central.....	109
8.1. Superación de las limitaciones del cultivo de LCR en meningitis crónicas	109
8.2. Detección de encefalitis virales raras y virus neurotrópicos emergentes.....	110
8.3. Análisis de la microbiota del SNC	111
8.4. Identificación de neuroparásitos y hongos dimórficos mediante mNGS.....	114
8.5. Diagnóstico diferencial molecular en procesos autoinmunes vs. infecciosos	116
8.5.1. Impacto del volumen de muestra en la sensibilidad diagnóstica del LCR	117
8.5.2. Uso de la metagenómica en el diagnóstico post-mortem de patologías infecciosas	117

8.5.3. Detección de priones y variantes genéticas en enfermedades neurodegenerativas	119
8.6. Protocolos de urgencia para el diagnóstico de meningitis bacteriana decapitada	120
8.7. Correlación entre pleocitosis y abundancia de lecturas genómicas	121
8.7.1. Controversias actuales, análisis crítico de la evidencia y perspectivas futuras ...	121
Capítulo IX.....	123
El Paciente Inmunocomprometido: Vigilancia en Trasplante y Onco-Hematología	123
9.1. Monitoreo de la reactivación viral (CMV, EBV, BKV) mediante secuenciación cuantitativa.....	123
9.2. Identificación de patógenos oportunistas en el receptor de trasplante de órgano sólido	124
9.3. Metagenómica en el trasplante de progenitores hematopoyéticos	125
9.4. Controversias actuales, análisis crítico de la evidencia y perspectivas futuras.....	128
9.5. Detección temprana de infecciones fúngicas invasivas (Aspergilosis/Mucormicosis)	130
9.5.1. Dinámica del microbioma intestinal como predictor de complicaciones infecciosas.....	130
9.5.2. Impacto de la neutropenia febril en la composición del metagenoma sanguíneo	131
9.5.3. Evaluación de la inmunidad viral mediante perfiles de expresión de interferón.	132
9.6. Vigilancia de brotes nosocomiales en unidades de oncología mediante filogenética	133
9.7. Personalización de la profilaxis antimicrobiana basada en el resistoma basal	134
9.7.1. Detección de <i>Pneumocystis jirovecii</i> y coinfecciones en pacientes con VIH..	135
9.7.2. Controversias actuales, análisis crítico de la evidencia y perspectivas futuras ...	136
Capítulo X.....	139
Integración de la Metagenómica en los Programas de Optimización de Antimicrobianos (PROA)	139

10.1. Algoritmos de decisión para la transición de terapia empírica a dirigida	140
10.2. Reducción del uso de antibióticos de amplio espectro mediante diagnóstico rápido del resistoma	141
10.3. Uso de la mNGS para la gestión de la duración de los tratamientos	142
10.4. Integración de los resultados de metagenómica en la historia clínica electrónica....	145
10.5. Educación médica continua: Interpretando informes de taxonomía agnóstica.....	146
10.5.1. Barreras institucionales para la adopción de la mNGS en hospitales secundarios	147
10.6. Modelos de reembolso y justificación económica frente a la gerencia hospitalaria.	148
10.7. Impacto del diagnóstico molecular directo en la presión de selección de resistencias	149
10.8. Auditoría y feedback en tiempo real basados en datos genómicos de la planta	150
10.9. Controversias actuales, análisis crítico de la evidencia y perspectivas futuras	151
Capítulo XI.....	153
Vigilancia Epidemiológica Global y Metagenómica de Aguas Residuales	153
11.1. Monitoreo de la emergencia de patógenos con potencial pandémico en tiempo real	153
11.1.1. Secuenciación de aguas residuales (Wastewater surveillance) como sistema de alerta temprana.....	156
11.1.2. Seguimiento de la evolución viral y deriva antigénica mediante secuenciación masiva	157
11.2. Identificación de reservorios animales de enfermedades zoonóticas.....	158
11.3. Cooperación internacional en el intercambio de datos genómicos abiertos	159
11.3.1. Uso de la mNGS en el rastreo de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos	160
11.3.2. Mapeo global del resistoma ambiental y su conexión con la salud humana (One Health).....	161
11.4. Filogenómica de alta resolución para la identificación de cadenas de transmisión..	162

11.5. Implementación de la metagenómica en regiones con infraestructura de laboratorio limitada	163
11.5.1. El rol de la secuenciación portátil en misiones de respuesta rápida de la OMS	164
11.5.2. Controversias actuales, análisis crítico de la evidencia y perspectivas futuras .	165
Capítulo XII	168
Bioética del Big Data Genómico y el Futuro del Diagnóstico Autónomo.....	168
12.1. Privacidad del paciente en la era del metagenoma	168
12.2. Propiedad intelectual de secuencias genómicas y patentes de algoritmos.....	169
12.2.1. Consentimiento informado para el análisis agnóstico de patógenos y variantes humanas	172
12.3. Sesgos en la IA diagnóstica.....	173
12.4. Seguridad de los datos genómicos frente a ciberataques y bioterrorismo	174
12.5. El dilema de los hallazgos incidentales genéticos en el huésped.....	176
12.5.1. Regulación internacional de los dispositivos de secuenciación de uso doméstico	178
12.5.2. Sostenibilidad del Laboratorio de Microbiología 4.0: Impacto ambiental del cómputo.....	179
12.6. Controversias actuales, análisis crítico de la evidencia y perspectivas futuras	181
Referencias Bibliografía	183

Índice de tablas

Tabla 1	<i>La helicasa como un motor molecular regulador</i>	<i>6</i>
Tabla 2	<i>En la cinética de lisis diferencial: preservación de la integridad fúngica y bacteriana</i>	<i>24</i>
Tabla 3	<i>Microbiota comensal vs. invasión patogénica: definición de umbrales diagnósticos</i>	<i>43</i>
Tabla 4	<i>Principales elementos del aprendizaje profundo aplicado a la corrección de homopolímeros</i>	<i>53</i>
Tabla 5	<i>Bioinformática de la identificación taxonómica y procesamiento de datos</i>	<i>55</i>
Tabla 6	<i>Componentes de un sistema de alerta temprana para carbapenemasas</i>	<i>77</i>
Tabla 7	<i>Dinámica de la tormenta de citoquinas mediante RNA-seq directo</i>	<i>83</i>
Tabla 8	<i>Diferenciación entre translocación bacteriana y sepsis verdadera</i>	<i>101</i>
Tabla 9	<i>Análisis metagenómico de la microbiota del SNC</i>	<i>112</i>
Tabla 10	<i>Aplicaciones de la metagenómica en el trasplante de progenitores hematopoyéticos</i>	<i>125</i>
Tabla 11	<i>Aplicación de la mNGS en la gestión de la duración de los tratamientos</i>	<i>143</i>
Tabla 12	<i>Monitoreo en tiempo real de patógenos con potencial pandémico</i>	<i>154</i>
Tabla 13	<i>Propiedad intelectual de secuencias genómicas y patentes de algoritmos</i>	<i>170</i>

Índice de figuras

Figura 1	<i>Influencia del plegamiento secundario de ARN en la secuencia directa</i>	<i>14</i>
Figura 2	<i>Influencia del plegamiento secundario de ARN en la secuencia directa</i>	<i>17</i>
Figura 3	<i>Influencia del plegamiento secundario de ARN en la secuencia directa</i>	<i>23</i>
Figura 4	<i>Influencia del plegamiento secundario de ARN en la secuencia directa</i>	<i>48</i>
Figura 5	<i>Optimización del flujo de datos en arquitecturas de cómputo GPU</i>	<i>62</i>
Figura 6	<i>Detección de heteroresistencia en poblaciones bacterianas heterogéneas</i>	<i>73</i>

CAPÍTULO I

Biofísica de la Translocación de Ácidos Nucleicos en Nanoporos de Proteína

La evolución de la genómica diagnóstica ha transitado desde la dependencia de cultivos microbiológicos tradicionales hacia metodologías moleculares avanzadas que permiten una caracterización agnóstica de los ecosistemas biológicos. Como bien exponen (Nielsen et al., 2025), la metagenómica clínica se ha consolidado como un paradigma que trasciende las limitaciones de la PCR convencional al no requerir dianas genéticas preestablecidas, facilitando la identificación de patógenos en escenarios críticos donde el tiempo es un determinante de supervivencia. En el epicentro de esta revolución técnica se halla la secuenciación de tercera generación (TGS), específicamente la tecnología basada en nanoporos, cuya base biofísica radica en la monitorización de fenómenos electroquímicos a escala nanométrica.

La evolución de la secuenciación del material genético puede interpretarse como un proceso continuo que busca observar el genoma con mayor exactitud, velocidad y profundidad. La primera etapa, fundamentada principalmente en el método de Sanger, estableció las bases para la lectura sistemática de las secuencias de ADN y transformó el campo de la genética molecular. Posteriormente, surgió la segunda etapa, conocida como secuenciación masiva de nueva generación (NGS), que incrementó de manera notable el número de fragmentos que podían ser analizados simultáneamente, convirtiéndose en una herramienta fundamental para la investigación biomédica y el diagnóstico molecular.

Aun así, la fragmentación del ADN y la prevalencia de lecturas breves restringieron la capacidad de resolver áreas repetitivas, variantes estructurales, reordenamientos complejos y relaciones entre variantes distantes. Con la introducción de la tercera etapa, que se basa en tecnologías de lectura larga, esta situación se transformó, permitiendo el análisis de moléculas de ADN significativamente más largas y manteniendo información sobre la organización real del genoma. Actualmente, las plataformas de Oxford Nanopore Technologies y Pacific Biosciences son líderes en este enfoque y han expandido su utilidad hacia la investigación clínica y la medicina personalizada.

El aumento de la secuenciación de lectura larga subraya que ya no se limita a ser una tecnología experimental enfocada en la investigación básica. En 2024, revisiones especializadas resaltaron su creciente relevancia para el diagnóstico molecular, la selección de tratamientos y el análisis de enfermedades genéticas, especialmente porque facilita la

exploración de áreas del genoma que antes eran parcialmente inalcanzables con lecturas cortas. En particular, las aplicaciones clínicas se han enfocado en la identificación de variantes estructurales, expansiones de repeticiones, cambios epigenéticos y variantes de nucleótido único en regiones complejas.

La tecnología de Nanopore es fundamental, ya que proporciona un enfoque novedoso para comprender el material genético. En lugar de adherirse al método convencional de crear nuevas cadenas o interpretar señales fluorescentes, la secuenciación con nanoporos se fundamenta en el tránsito de una molécula de ácido nucleico a través de un pequeño poro en una membrana. Al interactuar la molécula con el poro, se modifica la corriente iónica del sistema, provocando variaciones eléctricas que pueden ser capturadas y, con la asistencia de algoritmos de análisis, transformarse en una secuencia de nucleótidos.

En el procedimiento implica conceptos de transporte molecular, fuerzas electrostáticas, diferencias de potencial eléctrico, interacción entre el ácido nucleico y el nanoporo, así como la dinámica de conformación y el control de la velocidad de paso. En consecuencia, entender la tecnología Nanopore implica más que solo familiarizarse con el equipo; se trata de aprehender la biofísica que describe cómo una molécula biológica atraviesa un canal nanométrico y cómo ese desplazamiento se convierte en información digital. De esta manera, la biofísica se erige como el fundamento que conecta la escala molecular con la información que finalmente interpreta el investigador o el especialista de salud.

El proceso de translocación de un ácido nucleico a través de un nanoporo no es un acto pasivo; está condicionado por elementos tales como el campo eléctrico, la conductividad iónica, las características geométricas y químicas del poro, la estructura de la molécula y el funcionamiento de proteínas motoras que controlan su desplazamiento. Cada variación en la corriente eléctrica transporta información sobre la naturaleza de la molécula que atraviesa el nanoporo, lo que implica que una pequeña propiedad física puede convertirse en una señal capaz de revelar datos genéticos.

La medicina de precisión adquiere un significado más profundo al considerar su capacidad para examinar grandes áreas del genoma. Esto no solo permite mantener el contexto de las variantes, sino que también facilita la detección de alteraciones estructurales, fusiones de genes, modificaciones epigenéticas, variantes complejas y patrones que, de otro modo, serían difíciles de reconstruir con fragmentos breves. Por ejemplo, en el ámbito de la oncología, se han explorado las aplicaciones del Nanopore para identificar mutaciones, variantes de

empalme, fusiones, cambios epigenéticos y otros biomarcadores que pueden ser esenciales para orientar decisiones en tratamientos.

De manera análoga, en situaciones de enfermedades raras, la lectura extensa puede ayudar a identificar alteraciones que suelen estar ocultas en análisis genéticos tradicionales, permitiendo así una caracterización molecular más exhaustiva del paciente. De este modo, la biofísica del nanoporo se transforma de ser meramente un conocimiento teórico de laboratorio a un componente fundamental que convierte una señal molecular en datos que se pueden interpretar en un contexto clínico.

En este marco, el Capítulo 1. Biofísica de la Translocación de Ácidos Nucleicos en Nanoporos de Proteína se ha estructurado para llevar al lector de manera gradual desde los fundamentos históricos y tecnológicos hasta el entendimiento del fenómeno molecular que permite la secuenciación mediante nanoporos.

La evolución de las tecnologías de secuenciación de primera, segunda y tercera generación, destacando sus aportes y limitaciones. Luego, se discute el surgimiento de Nanopore y el progreso de la secuenciación de lectura larga en el ámbito de la investigación y el diagnóstico clínico. Posteriormente, se examinan los principios biofísicos que gobiernan la translocación de ADN y ARN a través de nanoporos proteicos, incluyendo la función del campo eléctrico, la corriente iónica y las interacciones moleculares.

1.1. Dinámica de la corriente iónica a través de poros de α -hemolisina y MspA

La arquitectura fundamental de un secuenciador de nanoporos se basa en la inmersión de una proteína de canal en una bicapa lipídica sintética de alta resistencia eléctrica, la cual separa dos compartimentos electrolíticos. La transducción de información biológica en datos digitales se inicia mediante la aplicación de un gradiente de potencial eléctrico a través de esta membrana, lo que induce un flujo constante de iones, denominado corriente de base. (J. Zhang et al., 2022) describen este proceso como una técnica de detección de molécula única que elimina la necesidad de amplificación por PCR, mitigando así los sesgos de representación genómica y los errores derivados de la polimerización *in vitro*.

Históricamente, el desarrollo de estos biosensores estocásticos ha dependido de la ingeniería de proteínas formadoras de poros, como la α -hemolisina (α -HL), una toxina secretada por *Staphylococcus aureus*, y la porina A de *Mycobacterium smegmatis* (MspA). La biofísica de la translocación a través de la α -HL se caracteriza por la geometría de su lumen, que posee un "vestíbulo" y una constricción más estrecha. Sin embargo, como señalan (Van

Dijk et al., 2023), la resolución de base individual en la α -HL se veía limitada por la longitud de su zona de detección, que abarcaba múltiples nucleótidos simultáneamente, lo que generaba señales de corriente complejas y difíciles de deconvolucionar.

En contraste, el poro MspA presenta una morfología de embudo con una constricción significativamente más corta y estrecha, lo que optimiza la sensibilidad hacia el radio hidrodinámico y la carga de los nucleótidos que transitan por él. La dinámica de la corriente iónica es extremadamente sensible a la identidad química de la macromolécula; cada base (A, T, C, G) o sus variantes modificadas, como la 5-metilcitocina (5mC), ocluyen el poro de manera diferencial. Esta obstrucción estérica altera la conductancia del canal, provocando caídas de corriente específicas que se traducen en lo que se conoce como "señales de garabato" o *squiggles*. Según (Agustinho et al., 2024), esta capacidad de detectar modificaciones nucleotídicas directamente durante el tránsito molecular permite que plataformas como las de Oxford Nanopore Technologies (ONT) realicen un perfilado epigenético en tiempo real, una funcionalidad que las tecnologías de lectura corta no pueden igualar sin tratamientos químicos agresivos o protocolos adicionales de preparación de librerías.

La evolución hacia los poros de la serie R10, derivados de la proteína CsgG, ha refinado aún más esta cinética iónica. (Van Dijk et al., 2023) explican que el poro R10 integra múltiples regiones de lectura dentro del mismo canal, lo que incrementa sustancialmente la precisión del *basecalling* al permitir una validación redundante de cada base mientras atraviesa el sensor. Esta configuración biofísica permite alcanzar niveles de fidelidad superiores al 99.6% en lecturas *simplex* y hasta el 99.9% en lecturas *duplex*, cerrando la brecha de exactitud que históricamente separaba a la TGS de la secuenciación por síntesis de Illumina.

1.2. Cinética de la helicasa y control de la velocidad de translocación de bases

Uno de los desafíos biofísicos más complejos en la secuenciación de nanoporos es el control de la velocidad a la que el ácido nucleico atraviesa el sensor. En un estado de electroforesis libre, el ADN translocaría a una velocidad de microsegundos por base, lo que impediría la captura de datos con la resolución temporal necesaria para distinguir las fluctuaciones de corriente. Para resolver este inconveniente, se emplea una proteína motora, generalmente una helicasa, que se acopla al extremo de la molécula de ADN durante la preparación de la librería. (S. Zhang et al., 2025) ilustran cómo esta enzima actúa como un freno molecular o trinquete (*ratchet*), desenrollando la doble hélice y regulando el paso de una sola hebra a través del nanoporo a una velocidad controlada.

La cinética de esta helicasa es sensible a diversos factores ambientales y biofísicos. (Van Dijk et al., 2023) detallan que la temperatura operativa de la celda de flujo es un parámetro crítico para modular esta velocidad. Por ejemplo, al operar a temperaturas reducidas ($\sim 28^{\circ}\text{C}$), la actividad enzimática de la helicasa disminuye, lo que reduce la velocidad de translocación y mejora la relación señal-ruido, aumentando consecuentemente la precisión de la lectura. Por el contrario, temperaturas más elevadas aceleran el proceso, incrementando el rendimiento de datos totales (*throughput*) pero potencialmente comprometiendo la fidelidad si la tasa de muestreo del sensor no es suficiente para capturar las transiciones rápidas de corriente.

El control de la translocación no es solo una cuestión de velocidad constante, sino de una progresión coordinada base por base. El motor proteico utiliza la energía de la hidrólisis de ATP para superar la barrera termodinámica del desenrollamiento genómico. Como indican (Agustinho et al., 2024), esta sincronización enzimática asegura que el ADN no transite de manera errática, lo cual es vital para el éxito de los algoritmos de *basecalling* basados en redes neuronales recurrentes (RNN). Estos modelos computacionales están diseñados para interpretar la secuencia temporal de señales de corriente, y dependen de la estabilidad cinética proporcionada por la helicasa para asignar identidades nucleotídicas con alta confianza. Además, innovaciones recientes como la química V14 de ONT han introducido motores proteicos optimizados que permiten una secuenciación más estable y homogénea, minimizando los eventos de deslizamiento enzimático que solían introducir errores de inserción y deleción en regiones de homopolímeros.

La integración de este control cinético con técnicas de muestreo adaptativo (*adaptive sampling*) representa un avance biofísico sin precedentes. Como explican (Agustinho et al., 2024) y (Marchukov et al., 2023), este software permite que el secuenciador "decida" en tiempo real si continúa leyendo una molécula o si invierte el voltaje para expulsarla del poro. Este fenómeno es posible gracias a que la helicasa permite una lectura inicial suficiente para que el software compare la señal con una base de datos de referencia (como el genoma humano) y descarte las lecturas no deseadas, concentrando los recursos del sistema en la detección de señales microbianas de baja abundancia.

En el estudio se interpreta en la helicasa como un motor molecular regulador, cuya actividad no puede separarse de las fuerzas electroforéticas, la fricción, la energía libre y las fluctuaciones térmicas. El control de estos fenómenos determina la velocidad con la que cada segmento del ácido nucleico atraviesa el nanoporo y, por tanto, la calidad de la información genética obtenida.

Tabla 1*La helicasa como un motor molecular regulador*

Factor biofísico	Mecanismo de acción	Efecto sobre la translocación	Importancia en la secuenciación Nanopore
ATP	La helicasa utiliza la energía libre liberada durante la hidrólisis de ATP para producir cambios conformacionales y movimiento sobre el ácido nucleico.	Proporciona la energía necesaria para el desplazamiento controlado de la molécula.	Permite regular el avance del ADN o ARN y mantener una velocidad compatible con la detección de la señal eléctrica.
Energía libre	La hidrólisis de ATP modifica el estado energético de la proteína y favorece la transición entre diferentes estados conformacionales.	Determina la capacidad del motor para superar barreras energéticas durante cada ciclo de translocación.	Explica por qué la helicasa puede transformar energía química en movimiento molecular direccionado.
Cinética enzimática	La velocidad depende de las etapas de unión del ATP, hidrólisis, liberación de productos y cambios conformacionales de la helicasa.	Establece la frecuencia con la que el motor puede avanzar sobre la cadena.	Controla el tiempo de permanencia de cada región del ácido nucleico frente al nanoporo.
Helicasa	Actúa como motor molecular que se une al ácido nucleico y regula su desplazamiento mediante ciclos catalíticos.	Reduce y estabiliza la velocidad de translocación.	Evita que el ADN o ARN atraviese el nanoporo demasiado rápido y favorece una lectura eléctrica resolutive.
Fuerza electroforética	El campo eléctrico aplicado al nanoporo interactúa con las cargas del ácido nucleico y favorece su desplazamiento a través del canal.	Impulsa la molécula hacia el interior del nanoporo.	Proporciona la fuerza externa que permite la translocación y contribuye al movimiento direccionado.
Fricción molecular	La interacción del ácido nucleico con el medio acuoso, las paredes del nanoporo y las proteínas genera resistencia al movimiento.	Disminuye o limita la velocidad de desplazamiento.	Contribuye al equilibrio entre las fuerzas que impulsan y restringen la translocación.
Interacciones ácido nucleico–nanoporo	Los nucleótidos interactúan con residuos y estructuras presentes en el canal mediante fuerzas	Modifican la velocidad y estabilidad del paso por el poro.	Permiten que las diferentes configuraciones moleculares produzcan

	electrostáticas y otras interacciones moleculares.		cambios detectables en la corriente iónica.
Temperatura	Modifica la energía térmica, la movilidad molecular, la velocidad de las reacciones enzimáticas y la estabilidad de la proteína motora.	Puede acelerar las etapas cinéticas hasta cierto límite; temperaturas excesivas pueden afectar la estabilidad funcional.	Es fundamental para mantener un equilibrio entre actividad de la helicasa, estabilidad molecular y calidad de la señal.
Fluctuaciones térmicas	El movimiento molecular aleatorio aumenta con la energía térmica y afecta las conformaciones de la helicasa y del ácido nucleico.	Introduce variaciones en la velocidad y posibles eventos de retroceso o pausas.	Influye en la variabilidad de las señales registradas y en la precisión de la lectura.
Conformación de la helicasa	La proteína alterna entre diferentes estados estructurales asociados con la unión e hidrólisis de ATP.	Determina cuándo el motor se detiene, avanza o puede retroceder.	Permite un control fino del desplazamiento de la cadena a través de la región censora.
Secuencia del ácido nucleico	Las características de la secuencia pueden modificar las interacciones entre el sustrato y el motor molecular.	Puede producir diferencias en la velocidad de avance y en los tiempos de permanencia.	Explica parte de la variabilidad de la señal y de la cinética observada durante la secuenciación.
Tiempo de permanencia	Corresponde al intervalo durante el cual una región de la molécula permanece dentro de la zona sensible del nanoporo.	Una mayor permanencia facilita la adquisición de información eléctrica; una permanencia demasiado corta dificulta la resolución.	Es determinante para convertir las variaciones de corriente iónica en información sobre la secuencia.
Corriente iónica	El paso de iones a través del nanoporo cambia cuando diferentes segmentos del ácido nucleico ocupan el canal.	La señal eléctrica refleja el estado molecular presente en el nanoporo.	Constituye la señal primaria que los sistemas Nanopore procesan para determinar la secuencia.
Equilibrio de fuerzas	Resulta de la interacción entre fuerza electroforética, acción del motor, fricción y fluctuaciones térmicas.	Determina la velocidad neta y la dirección de la translocación.	Define las condiciones bajo las cuales puede realizarse una lectura molecular estable y reproducible.

Nota: Elaboración propia a partir de y (Marchukov et al., 2023),

La dinámica de la helicasa es fundamental para comprender el funcionamiento de la secuenciación mediante nanoporos. Esta proteína sirve como un motor molecular que dirige el desplazamiento del ADN o ARN hacia el interior del canal de detección. Emplea la energía

libre producida al descomponer ATP para generar cambios en su estructura y gestionar el movimiento a lo largo de la cadena de ácidos nucleicos.

Desde una perspectiva biofísica, la tasa de translocación es resultado de un delicado balance entre diversos elementos: la energía química del ATP, la actividad cinética de la enzima, la fuerza electroforética del campo eléctrico, la fricción molecular del medio, y las interacciones entre el ácido nucleico, la helicasa y las paredes del nanoporo. Además, la temperatura juega un papel significativo, puesto que sus variaciones afectan la energía térmica disponible, la movilidad de las moléculas y la rapidez de las reacciones enzimáticas. Esto puede facilitar el movimiento hasta cierto grado, pero si la temperatura es excesivamente alta, podría perjudicar la estabilidad estructural y funcional de la proteína.

Al examinar todos estos factores, se hace claro que la helicasa no solo transporta la molécula, sino que también controla la velocidad de lectura. Las paradas, los progresos y los retrocesos del motor determinan el tiempo que cada segmento permanece frente a la zona censora del nanoporo.

En la regulación es esencial, ya que una translocación demasiado acelerada podría obstaculizar la capacidad del sistema para detectar las variaciones en la corriente iónica relacionadas con los nucleótidos. En contraste, un movimiento bien controlado permite obtener señales eléctricas con la resolución necesaria para reconstruir la secuencia genética.

1.3. Biofísica de las lecturas ultra-largas (Ultra-long reads) y su rol en el ensamblaje de novo

La característica más distintiva y disruptiva de la secuenciación por nanoporos es su capacidad para generar lecturas cuya extensión está limitada únicamente por la integridad física del fragmento de ácido nucleico introducido. Mientras que las tecnologías de segunda generación se ven restringidas a fragmentos de unos pocos cientos de pares de bases, los nanoporos pueden procesar lecturas de megabases de longitud. (Van Dijk et al., 2023) mencionan que se han reportado lecturas que superan los 4 Mb, lo cual es suficiente para abarcar genomas bacterianos completos en una sola secuencia continua.

La biofísica de estas lecturas ultra-largas (ULR) es fundamental para resolver la "materia oscura" de los genomas, las regiones altamente repetitivas, los elementos genéticos móviles y las variaciones estructurales complejas. Como argumentan (Agustinho et al., 2024), las lecturas cortas suelen fragmentarse al encontrarse con repeticiones intragenómicas que son más largas que la propia lectura, lo que resulta en ensamblajes altamente fragmentados y llenos

de brechas (*gaps*). Las ULR actúan como "puentes" físicos que atraviesan estas regiones repetitivas, permitiendo un ensamblaje *de novo* mucho más contiguo y preciso.

El impacto de las ULR en la metagenómica clínica es profundo. En el estudio de brotes hospitalarios, la capacidad de discernir si un gen de resistencia a los antimicrobianos (AMR) se encuentra en el cromosoma bacteriano o en un plásmido es crucial para entender la dinámica de transmisión horizontal. (Agustinho et al., 2024) destacan que las lecturas largas permiten el ensamblaje completo de plásmidos circulares y la identificación de eventos de transferencia genética que serían indetectables con lecturas cortas. Además, en el ámbito de la genómica humana, las ULR han facilitado la publicación de los primeros genomas completos de telómero a telómero (T2T), resolviendo regiones Centroamérica y acrocéntricas que antes se consideraban inescrutables.

Sin embargo, la obtención de ULR impone exigencias biofísicas rigurosas durante la fase preanalítica. La extracción de ADN de ultra alto peso molecular (UHMW) requiere protocolos que minimicen el estrés de cizallamiento mecánico. (Van Dijk et al., 2023) señalan que los métodos convencionales de extracción no son aptos para este fin, siendo necesario recurrir a técnicas de lisis suave y purificación basadas en discos magnéticos o membranas especiales que preserven la linealidad de las macromoléculas. Una vez en la celda de flujo, la dinámica de estas moléculas gigantes también es distinta; su viscosidad y comportamiento hidrodinámico dentro de los microcanales del secuenciador pueden influir en la eficiencia de captura por parte de los nanoporos.

El ensamblaje *de novo* impulsado por ULR elimina el sesgo de confirmación inherente a los métodos basados en mapeo contra referencias. En entornos metagenómicos complejos, donde pueden coexistir múltiples cepas estrechamente relacionadas, las lecturas largas permiten realizar un "faseado" genómico, es decir, separar los haplotipos y distinguir variantes de cepas específicas dentro de una población mixta. Como bien sintetizan (Agustinho et al., 2024), esta capacidad de reconstruir genomas completos a partir de muestras ambientales o clínicas sin conocimiento previo de su composición es lo que define el verdadero potencial de la metagenómica shotgun moderna, permitiendo una vigilancia genómica con una resolución sin precedentes para la salud pública global.

En conclusión, la biofísica de la secuenciación de nanoporos representa una integración magistral de la ingeniería de proteínas, la electroquímica y la computación avanzada. Desde la modulación de corrientes iónicas en canales de MspA hasta la regulación cinética mediada por helicasas y la explotación de lecturas ultra-largas para el ensamblaje genómico total, esta

tecnología ha redefinido los límites de lo que es posible en el diagnóstico microbiológico y la investigación genómica contemporánea.

1.4. Química de motores enzimáticos y estabilidad de la señal eléctrica en condiciones de flujo

La piedra angular de la precisión en la secuenciación por nanoporos reside en la regulación exquisita de la cinética de translocación. En un sistema de electroforesis pura, la velocidad de tránsito de un ácido nucleico a través de un canal proteico superaría la capacidad de muestreo de los sensores electrónicos actuales, resultando en una pérdida absoluta de resolución de base individual. Para mitigar este fenómeno, se emplean motores moleculares, predominantemente helicasas de alta procesividad, que se anclan al complejo de preparación de la biblioteca. Como bien analizan (Q. Zhang et al., 2023), estas enzimas actúan como dispositivos de control cinético o "trinquetes moleculares", utilizando la energía derivada de la hidrólisis del trifosfato de adenosina (ATP) para desenrollar la doble hélice y permitir el paso segmentado de una sola hebra a través del lumen del poro.

La estabilidad de la señal eléctrica es dependiente de la interacción termodinámica entre el motor proteico, el ácido nucleico y las condiciones fisicoquímicas de la celda de flujo. (Agustinho et al., 2024) destacan que las innovaciones en la química V14 de Oxford Nanopore Technologies (ONT) han optimizado la homogeneidad del flujo iónico, reduciendo las fluctuaciones estocásticas de la corriente que anteriormente inducían errores de *basecalling*. Esta estabilidad es crítica, ya que cualquier variación no programada en la velocidad de translocación altera el tiempo de permanencia (*dwell time*) de los nucleótidos en la zona de detección del poro, complicando la interpretación de las señales de "garabato" o *squiggles*.

Un determinante biofísico esencial en este equilibrio es la temperatura operativa del sistema. Según explican (Van Dijk et al., 2023), la modulación térmica permite a los investigadores ajustar el compromiso entre el rendimiento total de datos y la fidelidad de la lectura. Al reducir la temperatura a niveles específicos (aproximadamente 28 °C), la actividad catalítica del motor enzimático se desacelera, lo que aumenta la resolución temporal de los eventos de oclusión del poro. Este incremento en la relación señal-ruido facilita que los algoritmos basados en redes neuronales profundas identifiquen con mayor precisión las transiciones entre bases, alcanzando niveles de exactitud que superan el 99% en configuraciones de lectura tipo *duplex* (Van Dijk et al., 2023). La relevancia clínica de esta precisión es inmediata, especialmente en la detección de variantes de un solo nucleótido (SNV)

y en la caracterización de genes de resistencia antimicrobiana donde un solo error de lectura podría derivar en una interpretación errónea del fenotipo de resistencia.

1.4.1. Detección directa de modificaciones epigenéticas sin conversión de bisulfito

Uno de los avances más disruptivos de la biofísica de nanoporos es la capacidad de interrogar el estado epigenético del genoma de forma nativa. Históricamente, el estudio de la metilación del ADN ha dependido de la conversión química por bisulfito, un proceso agresivo que induce una degradación significativa de las macromoléculas y reduce la complejidad de la biblioteca genómica al convertir las citocinas no modificadas en uracilo. En contraste, la secuenciación de lectura larga permite la identificación de bases modificadas mediante la detección de perturbaciones sutiles en la conductancia iónica.

Tal como postulan (Agustinho et al., 2024), las bases modificadas como la 5-metilcitocina (5mC), la 5-hidroximetilcitocina (5hmC) o la N6-metiladenina (6mA) poseen radios hidrodinámicos y densidades de carga ligeramente distintos a sus contrapartes canónicas. Cuando estas moléculas transitan por la constricción del nanoporo (específicamente en los poros de la serie R10), generan perfiles de corriente iónica únicos. (Van Dijk et al., 2023) subrayan que esta tecnología permite el mapeo de patrones de metilación en regiones genómicas que son tradicionalmente inescrutables para las lecturas cortas, tales como elementos repetitivos, centrómeros y regiones teloméricas.

La eliminación de la conversión de bisulfito no solo preserva la integridad estructural del ADN, sino que también facilita un análisis multimodal simultáneo. (Van Dijk et al., 2023) indican que las plataformas de ONT pueden ahora realizar el "llamado" de la metilación como una "quinta base" directamente durante el proceso de secuenciación primaria, utilizando modelos de aprendizaje profundo entrenados para reconocer las firmas eléctricas de los nucleótidos modificados. Esta capacidad tiene implicaciones profundas en la metagenómica clínica y la oncología molecular. Por ejemplo, en el análisis de ADN libre de células (cfDNA) circulante, la detección directa de cambios en la metilación permite identificar el tejido de origen de un tumor o distinguir entre ADN derivado del huésped y del patógeno sin necesidad de protocolos de enriquecimiento costosos (Nielsen et al., 2025).

Además, la biofísica de nanoporos permite extender este análisis al ARN de manera directa, sin la necesidad de síntesis de ADN complementario (cDNA). (Agustinho et al., 2024) y (Van Dijk et al., 2023) mencionan que esta es la única tecnología capaz de secuenciar hebras de ARN nativo, lo que abre la posibilidad de estudiar el EPI transcriptoma completo,

incluyendo modificaciones como m⁶A que regulan la estabilidad y la traducción de los transcritos virales y bacterianos durante los procesos infecciosos.

1.4.2. Mecánica de la captura de fragmentos en bibliotecas de baja biomasa

El desafío biofísico de la metagenómica clínica se intensifica cuando el analito de interés se encuentra en concentraciones mínimas frente a un trasfondo abrumador de material genético del hospedador. En muestras de baja biomasa, como el líquido cefalorraquídeo (LCR) o muestras de sangre en etapas tempranas de sepsis, la probabilidad estocástica de que un fragmento de ADN patógeno interactúe con un nanoporo es extremadamente reducida.

Para superar esta limitación, la mecánica de captura ha sido optimizada mediante el uso de adaptadores especializados y técnicas de depleción del huésped. (L. Zhang et al., 2021) describen cómo la preparación de bibliotecas metagenómicas debe enfocarse en maximizar la captura de cada molécula única. Sin embargo, el problema persiste, la mayoría de los poros disponibles serán ocupados por ADN humano. Es aquí donde el muestreo adaptativo (*adaptive sampling*) o tecnología "ReadUntil" revoluciona la biofísica del sistema. Como detallan (Agustinho et al., 2024) y (Marchukov et al., 2023), este software permite que el secuenciador identifique la secuencia de los primeros cientos de bases que atraviesan el poro; si el software determina que la molécula pertenece al genoma del huésped, se instruye al sensor para que invierta la polaridad del voltaje, expulsando físicamente la hebra del canal y liberándolo para una nueva captura.

Este mecanismo de "rechazo activo" transforma el dispositivo en un filtro inteligente de baja biomasa. Al no secuenciar fragmentos humanos irrelevantes, se incrementa drásticamente la cobertura de las secuencias microbianas raras. (Ahannach et al., 2021) resaltan que, en entornos con biomasa limitada, la eficiencia de los métodos de extracción es crítica, ya que protocolos de lisis demasiado agresivos pueden fragmentar el ADN bacteriano, reduciendo la eficacia de los motores enzimáticos para iniciar la translocación. Por lo tanto, se recomienda el uso de métodos de extracción de ADN de alto peso molecular (HMW) que preserven la longitud de los fragmentos, lo que a su vez facilita el ensamblaje *de novo* y la identificación de patógenos con alta confianza clínica (Van Dijk et al., 2023).

En conclusión, la biofísica de la translocación en nanoporos integra una química de motores enzimáticos altamente regulada con la capacidad de interrogación epigenética directa y una mecánica de captura inteligente. Esta tríada tecnológica permite que la metagenómica shotgun transite de ser una herramienta de investigación a una plataforma diagnóstica robusta,

capaz de operar en los límites de la sensibilidad molecular y proporcionar datos genómicos completos en tiempos clínicamente accionables (Nielsen et al., 2025).

1.5. Optimización de la relación señal-ruido en dispositivos de detección portátil

La viabilidad clínica de los dispositivos portátiles, como el MinION o el diminuto Flongle, depende críticamente de la relación señal-ruido (SNR, por sus siglas en inglés). En un sistema donde las corrientes iónicas se miden en la escala de picoamperios (pA), cualquier fluctuación estocástica o interferencia electrónica puede oscurecer las sutiles diferencias de conductancia que identifican a cada nucleótido. Tal como analizan (Agustinho et al., 2024), las plataformas de Oxford Nanopore Technologies (ONT) han evolucionado significativamente en su ingeniería de poros para maximizar esta sensibilidad, transitando desde los canales R9 hacia la serie R10.

La arquitectura del poro R10 representa un hito biofísico al incorporar una zona de lectura extendida con múltiples puntos de restricción. Según explican (Van Dijk et al., 2023), esta configuración permite una detección redundante de la molécula mientras atraviesa el canal, lo que incrementa sustancialmente el SNR al permitir que los algoritmos de aprendizaje profundo validen la identidad de una base mediante señales eléctricas correlacionadas en diferentes niveles del poro. Esta redundancia física compensa el ruido térmico inherente a los biosensores estocásticos, facilitando una precisión en el llamado de bases (*basecalling*) que ahora compite directamente con las tecnologías de lectura corta (Van Dijk et al., 2023).

Además, la optimización del SNR en entornos portátiles requiere un control térmico riguroso. (Agustinho et al., 2024) destacan que la modulación de la temperatura de la celda de flujo a niveles operativos específicos ($\sim 28^\circ\text{C}$ en químicas recientes) es una estrategia biológica para ralentizar la actividad enzimática del motor proteico. Al desacelerar la translocación, se incrementa el tiempo de permanencia (*dwell time*) de cada nucleótido en la zona de detección, lo que permite una mayor tasa de muestreo por base y, consecuentemente, una señal más limpia y distinguible del ruido de fondo electrónico. Esta estabilidad es vital en dispositivos portátiles que operan fuera de los confines controlados de un laboratorio centralizado, donde las variaciones ambientales podrían comprometer la integridad de los datos genómicos (Nielsen et al., 2025).

1.6. Influencia del plegamiento secundario del ARN en la secuenciación directa (Direct-RNA seq)

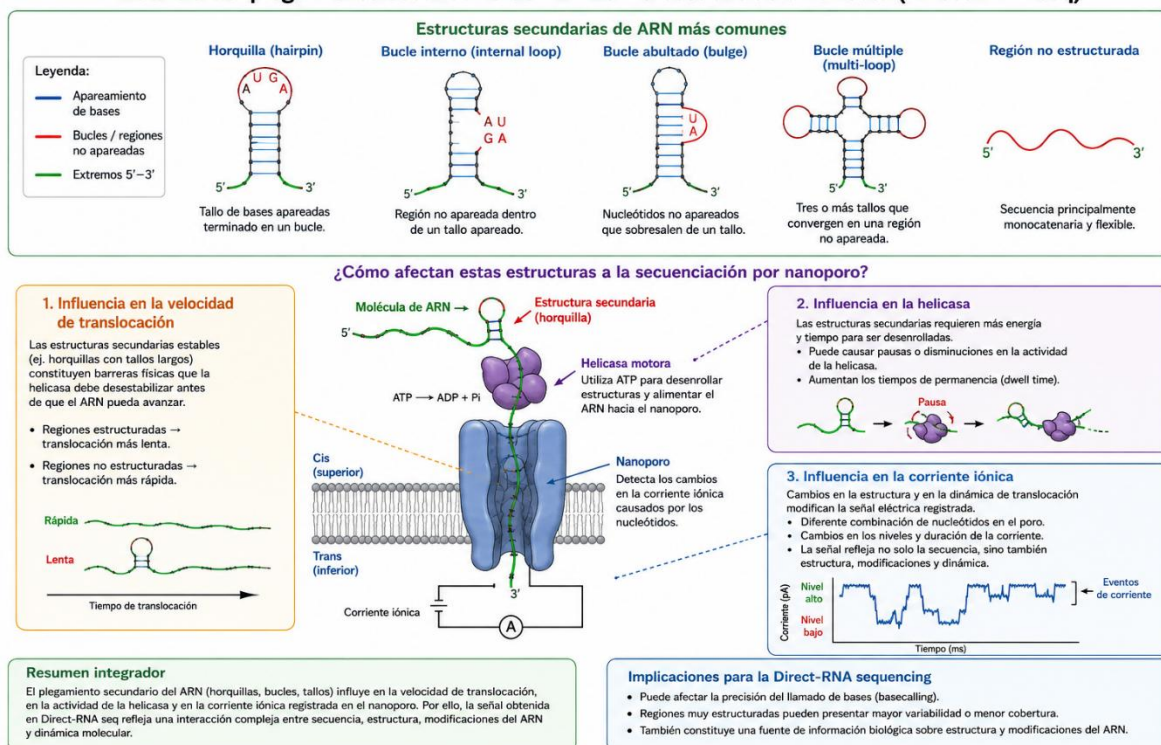
La secuenciación directa de ARN nativo es una funcionalidad exclusiva de la tecnología de nanoporos que evita los errores introducidos por la transcripción inversa y la síntesis de ADN complementario (cDNA). Sin embargo, la biofísica de la translocación del ARN se enfrenta al desafío intrínseco de su estructura secundaria. A diferencia del ADN, el ARN es una molécula monocatenaria que forma plegamientos intramoleculares complejos, como horquillas (*hairpins*) y bucles, estabilizados por interacciones termodinámicas de apareamiento de bases.

Como indican (Van Dijk et al., 2023), estos plegamientos secundarios imponen una barrera energética que el motor proteico debe superar para forzar la hebra a través del lumen estrecho del nanoporo. Si el motor no ejerce una fuerza de tracción suficiente para desenrollar estas estructuras de manera fluida, se producen eventos de pausa o saltos cinéticos que alteran el perfil de corriente iónica. (Agustinho et al., 2024) subrayan que estas irregularidades en la velocidad de translocación son interpretadas por los modelos de redes neuronales recurrentes (RNN) como anomalías de señal, lo que históricamente ha resultado en tasas de error más elevadas en ARN en comparación con ADN.

Figura 1

Influencia del plegamiento secundario de ARN en la secuencia directa

Influencia del plegamiento secundario del ARN en la secuenciación directa (Direct-RNA seq)



Nota: Elaboración propia a partir de (Van Dijk et al., 2023)

A pesar de estas dificultades, la persistencia de la estructura nativa es precisamente lo que permite la detección de modificaciones epigenéticas, o "epitranscriptómicas". (Agustinho et al., 2024) y (Van Dijk et al., 2023) explican que modificaciones como la N6-metiladenosina (m6A) no solo alteran sutilmente el radio hidrodinámico del nucleótido generando una firma eléctrica distintiva sino que también pueden influir en la estabilidad de los plegamientos locales. Por tanto, la biofísica del nanoporo permite una interrogación multimodal, se lee la secuencia lineal mientras se decodifican simultáneamente las perturbaciones eléctricas causadas por las modificaciones químicas presentes en el ARN original, un logro que las técnicas basadas en síntesis química no pueden replicar (Van Dijk et al., 2023).

1.6.1. La influencia en la rapidez de la translocación

En DRS, el ARN es trasladado a través del nanoporo por medio de un mecanismo que involucra una helicasa motora. Con el movimiento del ARN, se generan variaciones en la corriente iónica, las cuales son luego analizadas por algoritmos de basecalling. La helicasa es fundamental ya que controla la rapidez con la que el ARN se introduce en el poro, lo que a su vez afecta el tiempo que cada parte de la molécula permanece en la área sensible del sensor. Cuando el ARN forma una estructura secundaria estable, como una horquilla con tallo bien

emparejado, la helicasa debe realizar un mayor esfuerzo para descomponer o desenredar esa forma antes de que la cadena pueda continuar su avance (Van Dijk et al., 2023).

Desde un enfoque experimental, esto se traduce en diferencias en los tiempos de permanencia (dwell times) y en la dinámica del movimiento. Por lo tanto, una región estructurada puede llevar a una translocación menos consistente en comparación con una sección que es principalmente monocatenaria. Estudios recientes en DRS han mostrado que incluso algunas alteraciones en las bases pueden influir al mismo tiempo en la señal de corriente y en los tiempos de permanencia de la helicasa, lo que revela que la señal del nanoporo no se basa únicamente en la naturaleza de la base (Van Dijk et al., 2023).

1.6.2. Influencia sobre la helicasa

La helicasa funciona como un motor molecular que se encarga de suministrar el ARN al nanoporo de manera gradual. Su operación está basada en la hidrólisis de ATP, lo que le permite manejar el desplazamiento de la molécula a través del sensor. Esto implica que las estructuras secundarias proporcionan una dimensión mecánica adicional al procedimiento. Por ejemplo, una horquilla estable puede servir como un obstáculo que necesita ser deshecho para que la cadena pueda continuar avanzando (Van Dijk et al., 2023).

En donde se puede influir en la velocidad de la helicasa, causando pausas o variaciones en la rapidez de desplazamiento. Sin embargo, es importante evitar una simplificación excesiva: no todas las diferencias de velocidad observadas en DRS pueden ser atribuidas únicamente al plegamiento secundario, ya que también están involucradas la secuencia, las modificaciones del ARN, las condiciones experimentales, la interacción con el motor y las propiedades del nanoporo (Van Dijk et al., 2023).

En los aspectos son de particular importancia, ya que las modificaciones químicas en el ARN pueden ocasionar variaciones simultáneas en la corriente y en los tiempos de permanencia. Un estudio realizado en 2024, por ejemplo, indicó que ciertas alteraciones en la uridina modifican la señal de corriente y que algunas de ellas también impactan el tiempo de permanencia relacionado con la helicasa.

1.7. Evolución de la selectividad del poro

El éxito de los nanoporos en la secuenciación de ácidos nucleicos ha impulsado la investigación hacia la frontera de la proteómica de molécula única. La transición de discriminar cuatro bases nitrogenadas (A, C, G, T/U) a distinguir entre los 20 aminoácidos proteicos

estándar representa un desafío biofísico de magnitud superior, debido a la heterogeneidad química, de carga y de tamaño de las cadenas laterales de los aminoácidos.

Tal como sugieren (Van Dijk et al., 2023), la evolución de la selectividad del poro está transitando hacia el uso de porinas con geometrías aún más refinadas, como la porina A de *Mycobacterium smegmatis* (MspA), que posee una constricción extremadamente corta y sensible. A diferencia del ADN, que tiene un esqueleto de fosfatos con carga negativa uniforme que facilita su conducción electroforética, las proteínas poseen cargas netas variables. Esto exige el desarrollo de motores enzimáticos específicos o la adaptación de helicasas y desenvueltas (*unfoldases*) que puedan regular el tránsito de polipéptidos de manera estocástica pero controlada (Van Dijk et al., 2023).

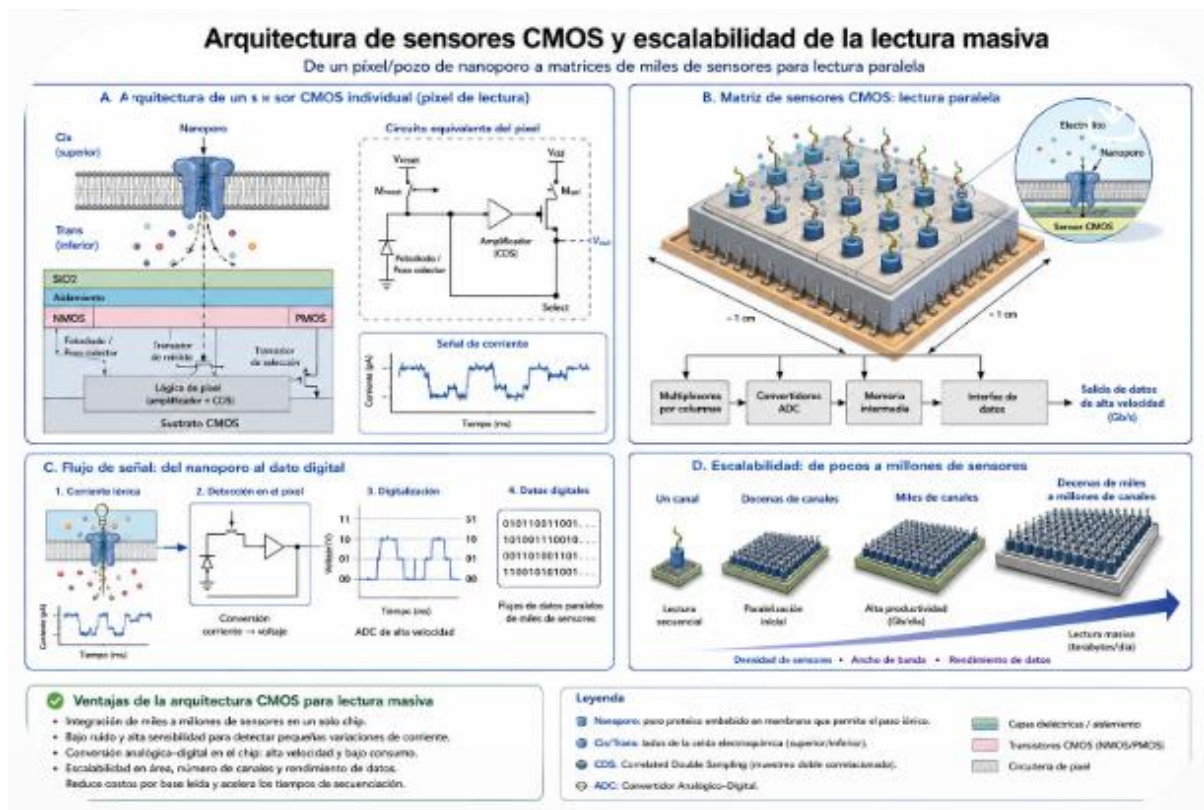
Como bien apuntan (Van Dijk et al., 2023) y (Agustinho et al., 2024), los avances recientes en la detección de péptidos sugieren que es posible identificar firmas eléctricas para aminoácidos individuales y sus modificaciones postraduccionales. Esta capacidad permitiría un perfilado proteómico de alta resolución en tiempo real, abriendo nuevas vías para el diagnóstico de enfermedades donde las variantes proteicas son determinantes patogénicos. La optimización de estos nanoporos proteicos mediante mutagénesis dirigida busca crear biosensores con una afinidad estérica tal que incluso las pequeñas diferencias entre aminoácidos isómeros puedan ser resueltas mediante cambios en la conductancia iónica del canal (Van Dijk et al., 2023).

1.8. Arquitectura de sensores CMOS y escalabilidad de la lectura masiva

La capacidad de escalar la secuenciación de nanoporos desde la detección de una sola molécula hasta la generación de terabases de datos reside en la arquitectura de los sensores de semiconductores de óxido metálico complementario (CMOS). Cada nanoporo en una celda de flujo está integrado sobre un circuito ASIC (circuito integrado de aplicación específica) que actúa como un amplificador y convertidor analógico-digital independiente. Según explican (Van Dijk et al., 2023), esta arquitectura permite que miles de poros operen de manera asíncrona y paralela, procesando señales eléctricas masivas con una latencia mínima.

Figura 2

Influencia del plegamiento secundario de ARN en la secuencia directa



Nota: Elaboración propia a partir de (Agustinho et al., 2024)

La escalabilidad es evidente al comparar el MinION, con 512 canales, frente al PromethION 48, que puede albergar hasta 144,000 poros operando simultáneamente. Como detallan (C. Zhang et al., 2023) y (Agustinho et al., 2024), esta densidad de sensores es lo que permite que la metagenómica de nanoporos compita con el rendimiento de las plataformas de Illumina. Además, la integración de procesadores de señales digitales en la base del sensor CMOS facilita funciones avanzadas como el muestreo adaptativo (*adaptive sampling*). Esta técnica, descrita por (Agustinho et al., 2024) y (Marchukov et al., 2023), permite que el software identifique una molécula en los primeros milisegundos de su tránsito; si la secuencia no es de interés (por ejemplo, ADN humano en una muestra clínica de baja biomasa), el sensor invierte el voltaje y expulsa la molécula, liberando el poro para capturar una nueva hebra de manera inmediata.

Esta sinergia entre la biofísica de la translocación y la ingeniería de estado sólido CMOS transforma el secuenciador en un dispositivo de filtrado inteligente. Como argumentan (Nielsen et al., 2025) y (Milburn et al., 2024), la capacidad de procesar grandes volúmenes de datos metagenómicos mientras se eliminan activamente las secuencias irrelevantes es fundamental para detectar patógenos en muestras críticas, como sangre o líquido cefalorraquídeo, donde la biomasa microbiana es mínima en comparación con el trasfondo del

huésped. En última instancia, la arquitectura CMOS no solo provee la fuerza bruta necesaria para la lectura masiva, sino que dota al sistema de la agilidad necesaria para un diagnóstico genómico de precisión en tiempos clínicamente accionables (Nielsen et al., 2025).

1.8.1. Controversias actuales, análisis crítico de la evidencia y perspectivas futuras

La implementación de la metagenómica shotgun mediante nanoporos de proteína ha generado un cambio disruptivo en la microbiología clínica, desplazando el enfoque desde la dependencia del crecimiento microbiano *in vitro* hacia una caracterización genómica agnóstica y directa. Sin embargo, este avance biofísico no está exento de debates técnicos y éticos que condicionan su adopción sistémica. Como bien analizan (Van Dijk et al., 2023), la principal tensión dialéctica reside en la dicotomía entre la velocidad de obtención de datos y la fidelidad absoluta de la secuencia, un equilibrio que ha evolucionado significativamente con la transición de los poros de la serie R9 a los sensores R10.4.1.

1.8.2. El dilema biofísico de la precisión y el error estocástico

Una de las controversias más persistentes en la secuenciación de tercera generación (TGS) es la tasa de error en la lectura de bases individuales. A diferencia de la secuenciación por síntesis de Illumina, donde la incorporación de nucleótidos marcados con fluorescencia permite una validación cíclica, la tecnología de nanoporos depende de la interpretación de fluctuaciones infinitesimales en la corriente iónica. (Agustinho et al., 2024) explican que, históricamente, los errores estocásticos derivados de la velocidad errática de la translocación y el ruido térmico en el sensor limitaban la precisión de la lectura primaria a niveles cercanos al 90-95%.

La evidencia actual sugiere que esta brecha se está cerrando gracias a la ingeniería de proteínas de canal con zonas de detección dual o múltiple. Según detallan (Van Dijk et al., 2023), la arquitectura R10 permite que cada fragmento de ADN sea interrogado de manera redundante por distintos puntos de restricción dentro del mismo poro, facilitando que los modelos de aprendizaje profundo (deep learning) realicen una corrección de errores en tiempo real. No obstante, persiste el análisis crítico sobre si esta precisión genotípica es suficiente para sustituir a las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (AST) basadas en fenotipos, especialmente en patógenos con mecanismos de resistencia multifactoriales o regulados por expresión génica (Manzoor et al., 2025).

1.8.3. Controversias en la interpretación metagenómica: El "Kit-oma" y el ADN ambiental

En el ámbito de la metagenómica clínica, una de las áreas de mayor escrutinio es la discriminación entre patógenos reales, contaminantes y microorganismos saprófitos. La extrema sensibilidad de los nanoporos permite detectar trazas de ADN que no están vinculadas al proceso infeccioso activo del paciente. (Nielsen et al., 2025) y (Albitar et al., 2023) subrayan que la presencia de material genético derivado de los kits de extracción, reactivos de laboratorio o incluso de la microbiota comensal del personal sanitario fenómeno conocido como "kit-oma" puede generar resultados falsos positivos que derivan en un uso inapropiado de antimicrobianos.

El análisis crítico de la evidencia recopilada en estudios de sepsis revela que establecer umbrales (thresholds) de detección es una tarea bioinformática de alta complejidad. (Benoit et al., 2024) postulan que la significancia clínica de una lectura genómica debe ser validada mediante paneles de adjudicación independientes que integren datos epidemiológicos, biomarcadores de inflamación como la procalcitonina y la evolución radiológica del paciente. Como señalan (Govender et al., 2025), en muestras de baja biomasa como el líquido cefalorraquídeo, la relación entre el material genético del huésped y el del patógeno es tan asimétrica que la pérdida de un solo fragmento crítico durante la preparación de la biblioteca puede resultar en un falso negativo, lo que subraya la necesidad de protocolos de depleción de ADN humano que sean altamente selectivos y no introduzcan sesgos taxonómicos (Ahannach et al., 2021).

1.8.4. Análisis crítico de la evidencia: Impacto clínico frente a rendimiento técnico

A pesar de la superioridad técnica documentada en términos de tiempo de respuesta (turnaround time), la comunidad médica internacional cuestiona si la metagenómica por nanoporos realmente mejora los desenlaces clínicos duros, como la mortalidad a los 28 días o la estancia en unidades de cuidados intensivos. (Yin, s. f.) demuestran que, en pacientes inmunocomprometidos con neutropenia febril, el uso de mNGS de plasma permitió un diagnóstico fúngico significativamente más rápido que el cultivo, facilitando una escalada terapéutica oportuna. Sin embargo, (Govender et al., 2025) advierten que aún faltan ensayos clínicos controlados aleatorizados (RCT) que demuestren de manera inequívoca que la rapidez diagnóstica se traduce en una reducción sistémica de la mortalidad.

La evidencia sugiere que el valor de la TGS no radica solo en la identificación del patógeno, sino en la capacidad de realizar una vigilancia genómica en tiempo real. Como exponen

(Struelens et al., 2024), la integración de datos de secuenciación con metadatos epidemiológicos permitió, durante la pandemia de COVID-19, rastrear la evolución de variantes con una agilidad sin precedentes. Este modelo de vigilancia "One Health" es la perspectiva futura para el control de brotes intrahospitalarios de organismos multirresistentes, donde el análisis biofísico de fragmentos ultra-largos permite distinguir si un gen de resistencia se encuentra en un plásmido altamente transmisible o integrado en el cromosoma bacteriano (Agustinho et al., 2024).

1.8.5. Perspectivas futuras: Hacia la proteómica de nanoporos y la medicina personalizada

El futuro de la biofísica de translocación trasciende la secuenciación de ácidos nucleicos. La frontera actual de la investigación se centra en la discriminación de aminoácidos individuales, lo que permitiría un perfilado proteómico de molécula única. (Van Dijk et al., 2023) anticipan que la ingeniería de nanoporos con constricciones adaptadas al radio hidrodinámico de los aminoácidos, combinada con motores proteicos de ultra-baja velocidad, habilitará la detección directa de modificaciones postraduccionales, las cuales son determinantes en la patogenia de enfermedades oncológicas y neurodegenerativas.

Asimismo, la integración de la inteligencia artificial (IA) "confiable" y transparente es fundamental para la transición de los biosensores estocásticos hacia dispositivos de diagnóstico en el punto de atención (POCT). (Goktas & Grzybowski, 2025) destacan que el desarrollo de algoritmos de *basecalling* que no funcionen como "cajas negras", sino que proporcionen métricas de confianza por cada base leída, será vital para obtener aprobaciones regulatorias definitivas por parte de agencias como la FDA o la EMA (Kardjadj, 2025).

En conclusión, la biofísica de la translocación en nanoporos se encuentra en un momento de maduración crítica. Mientras las controversias sobre la precisión y la contaminación exigen una refinación de los protocolos analíticos y bioinformáticos, la evidencia acumulada posiciona a esta tecnología como la piedra angular de la futura medicina de precisión. La capacidad de interrogar la vida a nivel molecular, en tiempo real y de manera agnóstica, redefinirá no solo cómo diagnosticamos las enfermedades infecciosas, sino cómo comprendemos la dinámica funcional de los ecosistemas biológicos en su conjunto.

Capítulo II

Preparación de Muestras y Estrategias Críticas de Depleción del ADN del Huésped

La optimización de la fase preanalítica en metagenómica clínica constituye, quizás, el determinante más crítico para el éxito del diagnóstico molecular agnóstico. En muestras complejas, la señal genómica de interés derivada de patógenos bacterianos, fúngicos o virales se encuentra frecuentemente inmersa en un océano de material genético humano, donde el genoma del hospedador puede superar en proporción de 10^6 a 1 al del microorganismo invasor (Shi et al., 2022). En donde la asimetría estequiométrica demanda una ingeniería de procesos que no solo elimine el trasfondo humano, sino que preserve la integridad de las macromoléculas microbianas para permitir una secuenciación de lectura larga (LRS) de alta fidelidad.

La preparación de muestras es una de las etapas más cruciales en la metagenómica clínica. Esto se debe a que la calidad del material que se obtiene influye directamente en nuestra capacidad para identificar y caracterizar los microorganismos que se encuentran en una muestra biológica. En muchos casos clínicos, el ADN microbiano solo representa una pequeña parte del material genético total, mientras que una gran parte corresponde al ADN del huésped. Esto puede dificultar la detección de microorganismos que están presentes en bajas concentraciones y, además, aumenta la cantidad de datos que necesitamos procesar más adelante.

En donde el sentido, las estrategias de depleción del ADN del huésped se enfocan en reducir selectivamente el material genético humano sin eliminar de manera significativa los ácidos nucleicos microbianos, lo que resulta en una muestra que está más enriquecida con información diagnóstica relevante. Para lograr esto, se han desarrollado diferentes enfoques que se basan en las diferencias físicas, químicas y moleculares entre el material del huésped y el de los microorganismos.

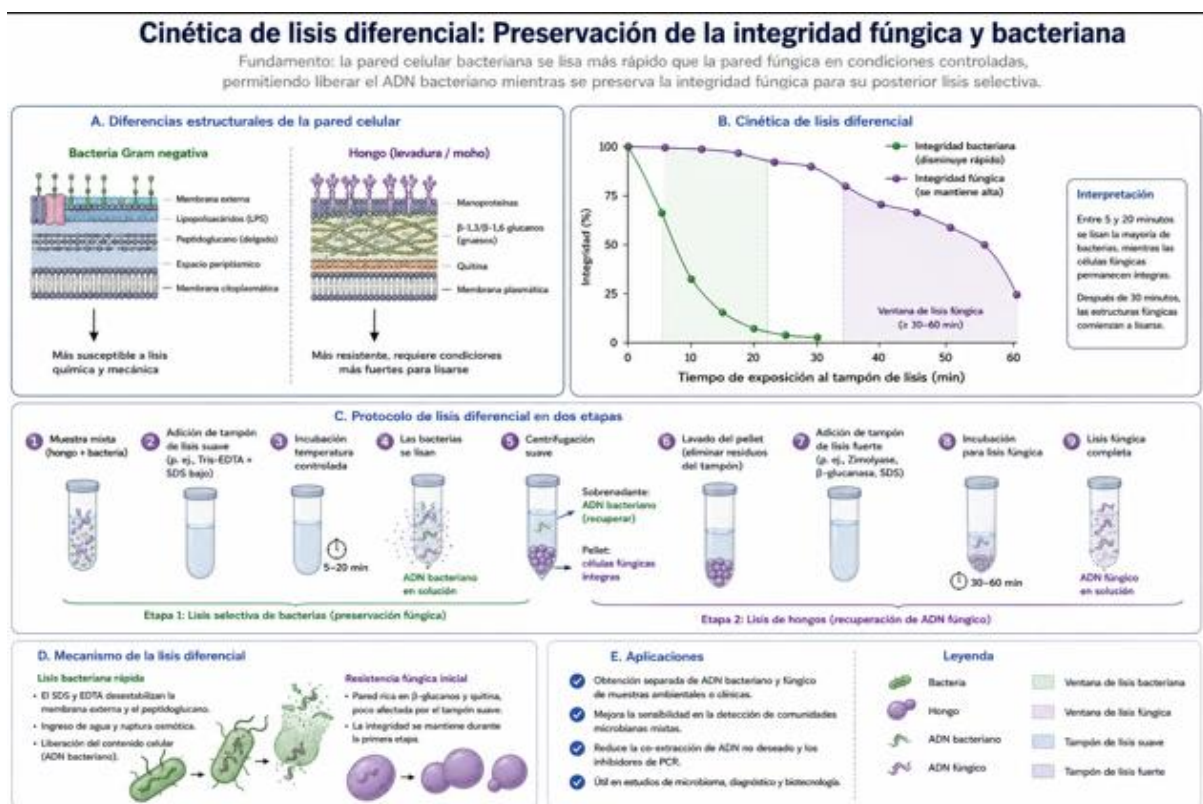
En donde se incluyen métodos de separación celular, degradación selectiva del ADN humano y técnicas de captura o eliminación diferencial. La elección de la estrategia adecuada depende de varios factores, como la naturaleza de la muestra, la carga microbiana, el estado de las células y las características de los microorganismos que queremos detectar. Es importante tener en cuenta que una depleción demasiado agresiva podría eliminar también ADN microbiano, lo que podría sesgar la composición de la comunidad.

2.1. Cinética de lisis diferencial: Preservación de la integridad fúngica y bacteriana

La liberación eficiente de ácidos nucleicos desde compartimentos celulares microbianos es un desafío biofísico mediado por la heterogeneidad estructural de las paredes celulares. Como bien exponen (Q. Zhang et al., 2023), la extracción exitosa requiere una discriminación cinética entre la membrana plasmática del hospedador, compuesta por una bicapa lipídica lábil, y las robustas paredes de peptidoglicano de las bacterias Gram-positivas o los polímeros de quitina y glucano de los hongos.

Figura 3

Influencia del plegamiento secundario de ARN en la secuencia directa



Nota: Elaboración propia a partir de (Van Dijk et al., 2023).

Las estrategias tradicionales de lisis masiva suelen fracasar en la detección de organismos "difíciles", como las micobacterias y ciertas levaduras, debido a que su liberación genómica requiere una energía de activación mecánica superior. Según el análisis de (Guo et al., 2025) y las optimizaciones de (Nielsen et al., 2025), la transición hacia un modelo de "lisis dual" es imperativa. Este proceso integra una agitación mecánica de alta velocidad (bead-beating) mediante vibración tridimensional con una hidrólisis enzimática selectiva. La cinética de este proceso es delicada, un estrés mecánico excesivo induce el cizallamiento de los fragmentos de ADN, reduciendo su longitud por debajo del umbral óptimo para plataformas

como Oxford Nanopore, lo que compromete la capacidad de ensamblaje *de novo* (Van Dijk et al., 2023).

En el contexto de la neumonía severa, la optimización de la lisis en muestras de lavado broncoalveolar (BALF) ha demostrado que el uso de homogeneizadores de alta velocidad permite una interrupción efectiva de las paredes celulares más resistentes, incrementando la sensibilidad diagnóstica para especies como *Bacillus subtilis* y *Cryptococcus neoformans* hasta en diez veces en comparación con los protocolos estándar (Q. Zhang et al., 2023). No obstante, esta energía cinética debe ser modulada para evitar la destrucción de genomas más frágiles, particularmente los virus de ARN, cuya estabilidad es inversamente proporcional a la intensidad de la homogeneización mecánica (Q. Zhang et al., 2023). La relevancia clínica de este equilibrio es inmediata, una lisis insuficiente resulta en falsos negativos para patógenos críticos, mientras que una lisis excesiva fragmenta el ADN, dificultando la identificación de genes de resistencia antimicrobiana (AMR) que residen en elementos genéticos móviles (Manzoor et al, 2025).

Tabla 2
En la cinética de lisis diferencial: preservación de la integridad fúngica y bacteriana

Aspecto	Bacterias	Hongos	Implicación en la lisis diferencial
Estructura celular	Presentan una pared celular cuya composición varía entre bacterias Gram positivas y Gram negativas.	Poseen una pared celular más compleja y resistente, constituida principalmente por quitina, glucanos y otros componentes estructurales.	Las diferencias estructurales determinan que cada grupo requiera condiciones de ruptura diferentes.
Resistencia a la lisis	Puede ser variable; las bacterias Gram positivas generalmente presentan mayor resistencia debido a su pared celular más gruesa.	Generalmente presentan mayor resistencia mecánica y química por la estructura de su pared celular.	La resistencia condiciona la intensidad y duración del procedimiento de lisis.
Velocidad de ruptura	Puede producirse relativamente rápido dependiendo de la especie y del método empleado.	Suele requerir mayor tiempo o una combinación de estrategias para conseguir una ruptura eficiente.	Una velocidad inadecuada puede generar una representación desigual de los microorganismos presentes.
Lisis enzimática	Puede favorecer la degradación de componentes de la pared	Requiere estrategias capaces de afectar los	Permite aumentar la eficiencia de extracción sin depender exclusivamente de

	bacteriana mediante enzimas específicas.	componentes estructurales de la pared fúngica.	tratamientos mecánicos intensos.
Lisis mecánica	Métodos físicos pueden facilitar la ruptura de células bacterianas resistentes.	Puede ser especialmente importante debido a la resistencia de la pared fúngica.	Una intensidad excesiva puede fragmentar los ácidos nucleicos y afectar la secuenciación de lectura larga.
Tratamiento químico	Los detergentes y otros agentes pueden alterar las membranas y facilitar la liberación del material intracelular.	Puede complementar la ruptura mecánica y enzimática de estructuras más resistentes.	Debe mantenerse dentro de condiciones que permitan una extracción eficiente sin deteriorar el ADN o ARN.
Temperatura	Modifica la velocidad de las reacciones químicas y enzimáticas involucradas en la lisis.	Influye igualmente sobre la actividad de los agentes de ruptura y la estabilidad molecular.	Un control inadecuado puede favorecer la degradación de los ácidos nucleicos.
Tiempo de exposición	Un tiempo insuficiente puede producir lisis incompleta; uno excesivo puede afectar la calidad molecular.	Puede requerir mayor exposición para alcanzar una ruptura adecuada.	El tiempo debe optimizarse para equilibrar eficiencia de lisis e integridad del material genético.
Liberación de ácidos nucleicos	La ruptura permite liberar ADN o ARN bacteriano para su posterior análisis molecular.	La ruptura de la pared permite recuperar material genético fúngico.	Una extracción equilibrada favorece una representación más completa de la comunidad microbiana.
Integridad del ADN	Puede verse afectada por fuerzas mecánicas excesivas, nucleasas o condiciones químicas desfavorables.	Puede deteriorarse por tratamientos prolongados o demasiado agresivos.	Es especialmente importante en secuenciación Nanopore, donde las moléculas largas aportan información relevante.
Sesgo de representación	Una lisis más sencilla puede provocar una mayor recuperación relativa de determinados grupos bacterianos.	Los hongos resistentes pueden quedar subrepresentados si la lisis resulta insuficiente.	La lisis diferencial debe reducir el sesgo entre microorganismos con distinta resistencia estructural.
Relación con la metagenómica	La recuperación eficiente permite identificar y caracterizar bacterias presentes en la muestra.	Una ruptura adecuada facilita la incorporación de la diversidad fúngica al análisis metagenómico.	La calidad de la preparación determina parcialmente la representatividad del perfil microbiano obtenido.
Relación con Nanopore	El ADN bacteriano íntegro puede generar lecturas largas y facilitar	La preservación del ADN fúngico permite obtener información genética más completa.	La calidad de la lisis condiciona la longitud y calidad de las moléculas

	la identificación molecular.		disponibles para secuenciación.
Objetivo principal	Obtener una liberación eficiente del material genético sin degradarlo.	Superar la mayor resistencia estructural conservando el material genético.	Conseguir una extracción equilibrada que preserve la diversidad

Nota: Elaboración propia a partir de y (Marchukov et al., 2023).

La cinética de la lisis diferencial puede considerarse un delicado equilibrio entre la destrucción de células, la extracción de ácidos nucleicos y la conservación de la integridad molecular. Debido a las variaciones estructurales entre bacterias y hongos, es fundamental tener en cuenta la resistencia de cada uno de estos grupos. Esto nos permite evitar que una lisis demasiado suave impida la recuperación de microorganismos resistentes o que un enfoque demasiado agresivo resulte en la fragmentación del ADN. En el campo de la metagenómica y la secuenciación con Nanopore, este equilibrio es esencial, ya que la calidad del análisis posterior depende en gran parte de que el material genético que obtenemos sea representativo de la comunidad microbiana y conserve una longitud adecuada para maximizar las ventajas de la secuenciación de lectura larga.

2.2. Mecanismos de depleción enzimática mediante nucleasas activadas por saponina

Para mitigar la interferencia del ADN humano, la depleción selectiva antes de la extracción se ha consolidado como un estándar de oro. El mecanismo molecular subyacente más eficaz utiliza la saponina, un glucósido de origen vegetal que interactúa con el colesterol de las membranas celulares animales para crear poros nanométricos, dejando intactas las membranas bacterianas que carecen de este esteroide. Como detallan (Ahannach et al., 2021) y (Marchukov et al., 2023), una vez que las células del hospedador son selectivamente permeabilizadas, su ADN genómico se libera al medio extracelular, volviéndose vulnerable a la digestión enzimática.

La introducción de nucleasas de amplio espectro, como la Benzonasa o la nucleasa HLESAN (nucleasa activa en sal estable al calor), permite la degradación de este ADN humano expuesto en fragmentos de apenas 3 a 5 pares de bases (Shi et al., 2022). Este proceso de "limpieza enzimática" es vital en muestras de baja biomasa, como el líquido cefalorraquídeo (LCR). (Milburn et al., 2024) argumentan que en estas muestras, incluso una mínima contaminación con células epiteliales o leucocitos puede saturar el flujo de datos del secuenciador.

Sin embargo, el uso de saponina y nucleasas no está exento de sesgos taxonómicos. El análisis crítico realizado por (Ahannach et al., 2021) sugiere que este método introduce una variabilidad significativa en la recuperación de taxones Gram-negativos, cuyas paredes celulares son más finas y susceptibles a la lisis accidental durante el proceso de depleción. Esta fragilidad estructural implica que patógenos como *Haemophilus spp.* o *Neisseria spp.* podrían ser digeridos junto con el ADN del hospedador, resultando en un perfil metagenómico sesgado (Ahannach et al., 2021). Por tanto, la aplicación de estos mecanismos debe ser calibrada según el nicho biológico; mientras que en muestras vaginales con predominio de Gram-positivos la técnica es altamente robusta, en muestras de saliva o piel se requiere una supervisión bioinformática rigurosa para compensar la pérdida potencial de microorganismos lábiles (Marchukov et al., 2023).

2.3. Uso de CRISPR-Cas9 para la eliminación dirigida de secuencias de ADN humano

En la frontera de la ingeniería genómica aplicada al diagnóstico, el sistema CRISPR-Cas9 ha emergido como una herramienta de depleción programable y de ultra precisión. A diferencia de la lisis diferencial, que es un proceso estocástico, la tecnología DASH (Depleción de Abundantes Secuencias por Hibridación) utiliza ARN guía (gRNA) diseñados específicamente para reconocer y cortar motivos repetitivos del genoma humano, como los elementos Alu, que constituyen aproximadamente el 11% de nuestra información genética (Shi et al., 2022).

El fundamento biofísico de esta estrategia consiste en tratar la biblioteca de secuenciación ya preparada con complejos de ribonucleoproteína Cas9. Al hibridarse con las secuencias humanas objetivo, la enzima induce cortes de doble hebra; posteriormente, el tratamiento con exonucleasas degrada estos fragmentos cortados, dejando intactas las moléculas que no coinciden con las guías, predominantemente el ADN del patógeno (Shi et al., 2022). Como señalan (Goktas & Grzybowski, 2025), esta capacidad de "edición diagnóstica" permite una eliminación de más del 99% de las secuencias irrelevantes, incrementando drásticamente la cobertura de los genomas microbianos raros.

A pesar de su elegancia teórica, el uso de CRISPR-Cas9 en la rutina clínica enfrenta barreras económicas y técnicas significativos. (Shi et al., 2022) subrayan que el diseño de bibliotecas de gRNA que abarquen la complejidad total del genoma humano es extremadamente costoso y técnicamente demandante. No obstante, en la secuenciación de lectura larga, esta técnica es particularmente ventajosa, al requerir solo un sitio de corte por fragmento largo, la eficiencia de remoción es sustancialmente mayor que en las lecturas cortas

de Illumina (Shi et al., 2022). Esta precisión molecular posiciona a CRISPR como una estrategia de vanguardia para la resolución de infecciones profundas donde la carga microbiana es mínima y los métodos enzimáticos convencionales carecen de la selectividad necesaria.

2.4. Enriquecimiento mediante sondas de captura híbrida para patógenos emergentes

En cuanto al objetivo no es solo caracterizar la microbiota comensal, sino identificar patógenos específicos o variantes emergentes bajo una presión epidemiológica extrema, el enriquecimiento mediante sondas de captura híbrida representa la estrategia de mayor sensibilidad. Este enfoque utiliza sondas de oligonucleótidos biotiniladas que son complementarias a secuencias diana de interés, ya sean genomas virales completos (como el SARS-CoV-2 o el virus del Ébola) o paneles de genes de resistencia antimicrobiana (Shi et al., 2022).

La dinámica de la captura híbrida permite una interrogación profunda de la muestra. Tras la hibridación en solución, los complejos sonda-diana se recuperan mediante perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina, permitiendo el lavado de todo el material genético no unido (incluyendo el ADN humano y la microbiota irrelevante). (Agustinho et al., 2024) destacan que esta técnica permite detectar microorganismos en concentraciones tan bajas como 1 unidad formadora de colonia por mililitro (UFC/mL), una sensibilidad que rivaliza con la PCR cuantitativa pero con la ventaja de proporcionar la secuencia genómica completa.

La aplicación clínica de la captura híbrida es fundamental para la vigilancia genómica global. (Struelens et al., 2024) explican que el uso de paneles de captura permite rastrear la evolución de virus zoonóticos y detectar eventos de transferencia horizontal de genes de resistencia con una resolución sin precedentes. Sin embargo, esta técnica introduce un "sesgo de búsqueda", a diferencia de la metagenómica shotgun pura, solo se detecta aquello para lo que se ha diseñado una sonda. Para mitigar esta limitación, se están desarrollando paneles de captura "agnósticos de reino" que contienen millones de sondas diseñadas para cubrir todas las familias de virus y bacterias conocidas que infectan a humanos, transformando la captura híbrida en un filtro inteligente capaz de identificar tanto lo esperado como lo inesperado (Struelens et al., 2024).

En conclusión, la preparación de muestras para metagenómica shotgun ha transitado desde métodos de extracción genérica hacia una orquestación sofisticada de lisis diferencial, depleción enzimática selectiva y edición genómica mediante CRISPR. La integración de estas estrategias es lo que permite que la secuenciación de nanoporos alcance su máximo potencial

clínico, proporcionando diagnósticos precisos y rápidos que son determinantes para la supervivencia en cuadros de sepsis y enfermedades infecciosas complejas (Nielsen et al., 2025).

La implementación de la metagenómica shotgun en el entorno clínico ha redefinido el diagnóstico de patologías infecciosas al proponer un análisis agnóstico del material genético total presente en una muestra biológica. No obstante, la transición de esta tecnología desde el laboratorio de investigación hacia el pie de cama del paciente exige una optimización rigurosa de los protocolos preanalíticos. En escenarios donde la biomasa microbiana es ínfima frente a la magnitud del genoma del hospedador, como ocurre en los fluidos procedentes de sitios normalmente estériles, la eficiencia de la extracción y la integridad de las macromoléculas recuperadas determinan la capacidad del sistema para generar datos con utilidad diagnóstica (Nielsen et al., 2025).

2.5. Protocolos de extracción "Ultra-Low Input" para muestras de sitios estériles

El análisis genómico de muestras con baja densidad de analito, como el líquido cefalorraquídeo (LCR) o el plasma en etapas prodrómicas de una bacteriemia, requiere protocolos de extracción que operen en el límite de la sensibilidad molecular. En estos contextos, el ADN microbiano circulante suele presentarse como ADN libre de células (cfDNA), caracterizado por una fragmentación natural extrema. Como bien analizan (Nielsen et al., 2025), el uso de sistemas especializados, como el kit QIAmp MinElute ccfDNA, es fundamental para capturar estos fragmentos sub-genómicos. Este proceso no se limita a una simple purificación, sino que emplea una química de adsorción en columna de sílice optimizada para retener polímeros de baja masa molecular, e luyéndolos en volúmenes ultra-reducidos (aproximadamente 30 μ L) para maximizar la molaridad de la biblioteca resultante (Nielsen et al., 2025).

La biofísica de la captura en condiciones de "Ultra-Low Input" se enfrenta al desafío de la pérdida estocástica de material durante la manipulación. (Agustinho et al., 2024) señalan que, mientras que la secuenciación convencional de lectura larga puede requerir aportes de entre 150 ng y 1 μ g de ADN de alta calidad para garantizar la procesividad del motor proteico, las muestras clínicas estériles a menudo proporcionan cantidades inferiores a los límites de cuantificación fluorométrica estándar. Para mitigar esta restricción, se han integrado técnicas de preparación de bibliotecas como el protocolo SRSly (Short Fragment Retention), diseñado específicamente para preservar y convertir fragmentos de ADN extremadamente cortos que de otro modo se perderían en los pasos de purificación con perlas magnéticas (Nielsen et al.,

2025). Esta estrategia permite que secuencias de apenas unas decenas de pares de bases típicas de la degradación por nucleasas del hospedador en procesos infecciosos sean ligadas con adaptadores compatibles con nanoporos, asegurando que la señal del patógeno no sea ignorada por el sensor CMOS (Nielsen et al., 2025).

Sin embargo, la captura de cfDNA microbiano en sitios estériles es una tarea de precisión asimétrica. Según el análisis de (Govender et al., 2025), en cultivos sanguíneos positivos, la concentración bacteriana permite una extracción más robusta mediante kits como el QIAmp BiOstic Bacteremia, los cuales están diseñados para romper la resistencia mecánica de las paredes celulares procariotas sin comprometer la pureza del ácido nucleico. La relevancia clínica de estos protocolos radica en su capacidad para reducir el tiempo de respuesta (*turnaround time*), permitiendo que la identificación de especies y la predicción de perfiles de resistencia ocurran de manera casi simultánea a la detección del crecimiento microbiano, desplazando así a las metodologías basadas en el subcultivo y las pruebas fenotípicas tradicionales (Govender et al., 2025).

2.6. Impacto de la fragmentación mecánica en la continuidad del ensamblaje metagenómico

La biofísica de la translocación en nanoporos depende intrínsecamente de la longitud del fragmento introducido; no obstante, la necesidad de liberar material genético desde microorganismos con estructuras celulares complejas, como las micobacterias o los hongos filamentosos, a menudo impone un estrés mecánico perjudicial. (Q. Zhang et al., 2023) y (Guo et al., 2025) destacan que la optimización de la lisis celular es un punto de inflexión en la metagenómica clínica. El uso de técnicas de agitación mecánica con microesferas (*bead-beating*) es imperativo para desestabilizar el peptidoglicano de las bacterias Gram-positivas y los polímeros de quitina fúngicos, pero la energía cinética aplicada puede inducir el cizallamiento estocástico del ADN (Q. Zhang et al., 2023).

Este fenómeno de fragmentación tiene consecuencias directas en la bioinformática del ensamblaje. Como explican (Agustinho et al., 2024) y (Van Dijk et al., 2023), la continuidad del ensamblaje *de novo* medida frecuentemente a través del estadístico N50 es inversamente proporcional al grado de fragmentación pre-secuenciación. Las lecturas ultra-largas (ULR) son vitales para resolver las regiones repetitivas del genoma microbiano, actuando como puentes físicos sobre elementos genéticos móviles y operones ribosomales que las lecturas cortas no pueden deconvolucionar (Van Dijk et al., 2023). Un protocolo de extracción excesivamente agresivo que reduzca la longitud media de los fragmentos a menos de 10 kb limitará el éxito

de algoritmos como MetaFlye o Hifiasm-meta, resultando en genomas ensamblados desde metagenomas (MAGs) altamente fragmentados e incompletos (Agustinho et al., 2024).

En el diagnóstico de la neumonía, (Q. Zhang et al., 2023) demuestran que una calibración precisa de la lisis en muestras de lavado broncoalveolar permitió una mejora significativa en la detección de *Mycobacterium tuberculosis* y *Cryptococcus neoformans*, microorganismos históricamente difíciles de recuperar debido a sus robustas cubiertas celulares. Al optimizar las condiciones de lisis diferencial (denominadas como condición C002), se logró un equilibrio donde la integridad del ADN fue suficiente para mantener una longitud de lectura adecuada para la clasificación taxonómica, sin comprometer la sensibilidad de detección para patógenos de biomasa limitada (Q. Zhang et al., 2023). Este equilibrio es crítico en la vigilancia genómica de la resistencia antimicrobiana (AMR), ya que la fragmentación excesiva puede separar físicamente un gen de resistencia de su contexto genómico original (por ejemplo, impidiendo determinar si un gen *blaKPC* reside en un plásmido altamente transmisible o en el cromosoma bacteriano), lo cual tiene implicaciones epidemiológicas de primer orden (Agustinho et al., 2024).

2.7. Inhibidores de la polimerasa en matrices complejas: Sangre, LCR y líquido sinovial

Uno de los obstáculos biofísicos más subestimados en la secuenciación de tercera generación es la presencia de compuestos endógenos en las matrices clínicas que interfieren con las enzimas necesarias para la preparación de bibliotecas y la translocación controlada. En muestras de sangre, el grupo hemo y sus productos de degradación actúan como potentes inhibidores de las polimerasas y ligasas enzimáticas (Nielsen et al., 2025). De manera similar, en el líquido sinovial, la alta viscosidad conferida por el ácido hialurónico y la presencia de detritos proteicos pueden ocluir físicamente los nanoporos o reducir la eficiencia de captura de las moléculas de ADN (Elbehiry et al., 2025).

Para contrarrestar este fenómeno, los protocolos de purificación deben incluir pasos de "limpieza" ultra-eficientes. (Ahannach et al., 2021) y (Marchukov et al., 2023) discuten el uso de reactivos de deplesi3n selectiva que eliminan proteínas y lípidos del huésped antes de la lisis bacteriana total. La aplicaci3n de nucleasas, como la Benzonasa, bajo condiciones salinas específicas permite digerir el ADN humano libre en matrices complejas, dejando intactos los genomas microbianos protegidos por sus paredes celulares (Shi et al., 2022). Este proceso no solo elimina el trasfondo genético irrelevante, sino que simultáneamente reduce la concentraci3n de inhibidores poliméricos que podrían afectar la calidad de la seál eléctrica en el sensor (Shi et al., 2022).

En el líquido cefalorraquídeo, la interferencia proteica y la baja celularidad exigen una mecánica de captura que priorice la relación señal-ruido. (Milburn et al., 2024) y (Olie et al., 2024) enfatizan que, en cuadros de meningitis, incluso pequeñas trazas de inhibidores pueden derivar en falsos negativos debido a la ya de por sí baja biomasa del patógeno. La integración del muestreo adaptativo (*adaptive sampling*) en las plataformas de nanoporos surge como una solución biofísica innovadora frente a matrices complejas. Como detallan (Agustinho et al., 2024) y (Marchukov et al., 2023), esta técnica permite que el sistema identifique y rechace activamente las secuencias del huésped en tiempo real, invirtiendo la polaridad del poro para expulsar fragmentos no deseados. Este mecanismo actúa como un "filtro inteligente" que compensa la presencia de inhibidores al concentrar los recursos de secuenciación en las moléculas de interés biológico, permitiendo la reconstrucción de perfiles metagenómicos completos incluso en muestras donde la química de la matriz clínica es hostil para las reacciones moleculares convencionales (Nielsen et al., 2025).

En conclusión, la preparación de muestras para metagenómica shotgun de lectura larga exige una orquestación sofisticada de biometría molecular. Desde el refinamiento de la captura de cfDNA en protocolos "Ultra-Low Input", pasando por la modulación cinética de la lisis mecánica para preservar la continuidad del ensamblaje, hasta el control biofísico de los inhibidores en matrices clínicas difíciles, cada paso es determinante. Solo a través de esta ingeniería preanalítica es posible transformar la secuenciación de nanoporos en una herramienta diagnóstica de precisión, capaz de resolver infecciones complejas en tiempos clínicamente críticos (Nielsen et al., 2025).

La implementación de la metagenómica shotgun en el ámbito clínico ha supuesto una transición desde el reduccionismo de la identificación basada en cultivos hacia una visión holística y agnóstica de la composición genómica de los fluidos biológicos. Sin embargo, la robustez de este diagnóstico molecular no reside únicamente en la capacidad de secuenciación masiva, sino en la integridad y pureza del material genético de entrada. En muestras procedentes de sitios anatómicos estériles o con baja biomasa microbiana, la interferencia del material genético del hospedador y la contaminación exógena constituyen los principales obstáculos biofísicos que pueden invalidar la utilidad clínica de la prueba (Nielsen et al., 2025).

2.8. Estandarización de controles internos negativos y el problema del "kit-oma"

Uno de los desafíos más críticos y persistentes en la metagenómica de alta sensibilidad es el fenómeno conocido como "kit-oma". Este término define el microbioma inherente a los reactivos de laboratorio, columnas de extracción y kits de purificación, el cual puede introducir

una señal biológica espuria que compite con los patógenos reales de la muestra. Como bien analizan (Albitar et al., 2023) y (Nielsen et al., 2025), la presencia de trazas de ADN ambiental a menudo derivadas de géneros como *Delftia*, *Pseudomonas* o *Deinococcus* puede ser detectada por los secuenciadores de nanoporos, generando un ruido bioinformático que oscurece la señal de microorganismos de baja abundancia (Nielsen et al., 2025).

Para mitigar este riesgo, la estandarización de controles internos negativos se ha vuelto imperativa. Según el protocolo optimizado por (Nielsen et al., 2025), cada lote de procesamiento debe incluir al menos un control de proceso compuesto por agua libre de nucleasas, el cual atraviesa todas las fases de lisis, extracción y preparación de librerías en paralelo con las muestras clínicas. Esta estrategia permite identificar longitudinalmente las especies contaminantes recurrentes, alimentando una base de datos de "contaminantes de kit" que el software de análisis utiliza para establecer umbrales de exclusión (Nielsen et al., 2025).

2.8.1. Automatización robótica en la preparación de librerías para diagnóstico point-of-care

La viabilidad de la metagenómica shotgun como una herramienta de diagnóstico en el punto de atención (*point-of-care*, POC) depende de la capacidad de reducir el tiempo de intervención humana y minimizar la variabilidad operativa. La automatización robótica de las fases preanalíticas representa el puente tecnológico necesario para esta transición. En este sentido, plataformas como el dispositivo KingFisher de Thermo Fisher han sido validadas para la purificación automatizada de ácidos nucleicos a partir de hemocultivos y otros fluidos, integrando protocolos de lisis diferencial que depletamos activamente el ADN humano antes de la secuenciación (Pinzauti et al., 2025).

Como exponen (Agustinho et al., 2024) y (Pinzauti et al., 2025), el uso de robótica no solo acelera el flujo de trabajo, sino que permite una normalización precisa de las concentraciones de ADN, un paso crítico para garantizar la saturación óptima de los nanoporos en la celda de flujo. La química V14 de Oxford Nanopore, combinada con sistemas de barcoding rápido, permite que robots de manipulación de líquidos preparen librerías multiplexadas en menos de 60 minutos, lo que reduce el tiempo total de respuesta (*turnaround time*) a menos de 4 a 6 horas en entornos de cuidados críticos (Agustinho et al., 2024).

La relevancia clínica de esta automatización es especialmente notable en la vigilancia de la resistencia antimicrobiana (AMR). Al integrar sistemas robóticos que extraen ADN de colonias líquidas o directamente de muestras de sangre, se facilita la identificación de genes de resistencia como *mecA* o *blaKPC* con una resolución que las pruebas fenotípicas tardarían días

en alcanzar (Pinzaute et al., 2025). Además, como señalan (Kardjadj, 2025) y (Haghyegh et al., 2024), la convergencia de la microfluídica integrada (*lab-on-a-chip*) con sensores CMOS de estado sólido está permitiendo el desarrollo de dispositivos portátiles que realizan la extracción, amplificación y secuenciación en un sistema cerrado, mitigando el riesgo de contaminación cruzada y permitiendo la ejecución de diagnósticos genómicos complejos en regiones con infraestructura de laboratorio limitada (Kardjadj, 2025). Esta descentralización es fundamental para la preparación ante pandemias, permitiendo una respuesta rápida y basada en datos genómicos en el lugar exacto del brote (Nielsen et al., 2025).

2.8.2. Validación de métodos de purificación de ARN para transcriptómica dual

La transcriptómica dual es una frontera diagnóstica que busca interrogar simultáneamente la expresión génica del patógeno (el transcriptoma infeccioso) y la respuesta inmune del hospedador (el transcriptoma de defensa). Esta aproximación requiere métodos de purificación de ARN que preserven la inestabilidad intrínseca de las moléculas de ARN mensajero (mARN) frente a la ubicuidad de las ARNasas en las matrices clínicas. El uso de tubos de estabilización como PAXgene Blood RNA es una técnica estándar que utiliza reactivos de lisis inmediata para detener la degradación enzimática y fijar el perfil transcripcional en el momento de la extracción (Nielsen et al., 2025).

La validación de estos métodos de purificación en nanoporos se enfrenta al reto del alto trasfondo de ARN ribosomal (rARN) humano, que puede constituir hasta el 80-90% de la biblioteca. Como analizan (Nielsen et al., 2025) y (Van Dijk et al., 2023), la depleción selectiva de rARN mediante hibridación con sondas magnéticas o la eliminación de mARN humano poliadenilado permite enriquecer las señales de ARN microbiano. No obstante, en la secuenciación directa de ARN nativo, la biofísica de la molécula con sus plegamientos secundarios y modificaciones químicas impone una cinética de translocación más lenta (~70 bases/segundo) que la del ADN, lo que exige una pureza del analito excepcionalmente alta para evitar el bloqueo de los poros (Van Dijk et al., 2023).

La aplicación de modelos de aprendizaje profundo para la clasificación de firmas transcripcionales del hospedador ha demostrado una precisión superior al 98% en la discriminación entre infecciones virales y bacterianas (Nielsen et al., 2025). (Marchukov et al., 2023) y (Agustinho et al., 2024) destacan que la validación de estos métodos de purificación debe incluir métricas de calidad de lectura rigurosas, como el N50 de los fragmentos de ARN y la puntuación Phred de fidelidad de base, para asegurar que los algoritmos de inteligencia artificial puedan identificar correctamente las variantes estructurales y las modificaciones

epigenéticas (como la m^6A) que regulan la virulencia patogénica durante la infección activa (Agustinho et al., 2024). En última instancia, la validación de protocolos para transcriptómica dual no solo mejora la identificación de patógenos difíciles de cultivar, sino que proporciona una ventana terapéutica única al permitir el monitoreo de la eficacia de la inmunoterapia y la respuesta antibiótica a nivel molecular (Nielsen et al., 2025).

En conclusión, el éxito de la metagenómica shotgun de lectura larga en la práctica médica depende de una ingeniería preanalítica que sea capaz de neutralizar el "kit-oma" mediante controles rigurosos, democratizar el acceso mediante la automatización robótica y expandir la capacidad diagnóstica a través de la transcriptómica dual validada. Esta orquestación técnica es la que permitirá que la secuenciación de nanoporos se consolide como el estándar de oro de la medicina de precisión para el siglo XXI (Nielsen et al., 2025).

Capítulo III

Taxonomía Agnóstica y la Disrupción del Dogma del Cultivo Microbiológico

La microbiología diagnóstica contemporánea se encuentra en una encrucijada histórica donde el paradigma centenario basado en el aislamiento de colonias puras está siendo desplazado por una visión de "taxonomía agnóstica". Como bien analizan (Nielsen et al., 2025), la dependencia histórica de la viabilidad microbiana para el diagnóstico de infecciones sistémicas ha impuesto una ventana de ceguera terapéutica que la metagenómica clínica busca cerrar mediante el interrogatorio directo de la señal genómica total. Este cambio no es meramente técnico, sino conceptual, pasamos de buscar aquello que sabemos cultivar a interrogar de manera omnisciente todo el espectro de polímeros biológicos presentes en una matriz clínica, permitiendo una resolución de especies y variantes que antes eran invisibles para el laboratorio convencional.

3.1. Límites de la sensibilidad analítica: mNGS frente a la amplificación por PCR multicanal

La superioridad analítica de la secuenciación metagenómica de nueva generación (mNGS) frente a las metodologías basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multicanal radica en su naturaleza no sesgada. Mientras que las plataformas de PCR multiplexadas están intrínsecamente restringidas por una arquitectura de cebadores y sondas diseñadas para dianas genéticas predefinidas, la mNGS opera bajo un principio de detección universal. Tal como exponen (Govender et al., 2025), los paneles de PCR multiplex, aunque veloces, sufren de un límite de detección determinado por la competencia entre cebadores en reacciones complejas, lo que puede resultar en una cobertura taxonómica estrecha que debe actualizarse constantemente ante la emergencia de nuevos linajes o mecanismos de resistencia.

Desde una perspectiva biofísica, la mNGS de nanoporos trasciende estas limitaciones al no requerir una amplificación enzimática cíclica sistémica de dianas específicas, lo que mitiga los sesgos de representación genómica. Como argumentan (Van Dijk et al., 2023) y (Agustinho et al., 2024), la capacidad de leer fragmentos de ADN y ARN nativos permite que la mNGS identifique microorganismos sin necesidad de conocimiento *a priori* sobre su secuencia, una característica vital en la identificación de patógenos que presentan una alta plasticidad genómica o variaciones estructurales complejas. El análisis crítico de (Power et al., 2016) subraya que, aunque la PCR posee una sensibilidad analítica excepcional para objetivos

aislados, su incapacidad para capturar la totalidad del microbioma infeccioso la posiciona como una herramienta de confirmación, mientras que la mNGS se consolida como la plataforma de descubrimiento definitiva para cuadros de sepsis y meningitis donde la etiología es incierta (Milburn et al., 2024).

La relevancia clínica de esta distinción es profunda. En el estudio de (Govender et al., 2025), la implementación de un flujo de trabajo metagenómico directo desde hemocultivos positivos permitió alcanzar una sensibilidad del 97% y una especificidad del 94%, superando con creces la capacidad diagnóstica de las pruebas bioquímicas convencionales. Además, la mNGS logró identificar infecciones polimicrobianas y especies que evaden rutinariamente la detección por MALDI-TOF debido a su similitud espectral, como en el caso de las variantes de *Klebsiella quasipneumoniae* que son erróneamente clasificadas como *K. pneumoniae* por las bases de datos de espectrometría de masas tradicionales (Govender et al., 2025). Esta precisión genotípica no solo mejora la identificación taxonómica, sino que permite una predicción de la resistencia antimicrobiana (AMR) hasta 20 horas más rápida que los métodos fenotípicos, lo que es determinante para la supervivencia del paciente en estado crítico (Govender et al., 2025).

3.1.1. El microbioma de la sangre

Uno de los dogmas más arraigados en la medicina es la esterilidad absoluta del compartimento hemático en ausencia de patología. Sin embargo, la llegada de biosensores moleculares de alta sensibilidad ha revelado que la sangre es un ecosistema dinámico caracterizado por la presencia de una señal genómica microbiana basal, un fenómeno denominado "DNAemia". Como detallan (Nielsen et al., 2025) y (Ciaparrone et al., 2024), el ADN microbiano libre de células (cfDNA) circula de manera constante en el plasma, proveniente de la translocación de microorganismos desde nichos mucosos como el intestino o la cavidad oral, incluso en individuos sanos.

La biofísica de esta DNAemia implica que la sangre actúa como un reservorio de "biopsia líquida" que refleja el estado de salud sistémica. (Parhofer et al., 2026) y (Nielsen et al., 2025) han demostrado que las concentraciones de cfDNA plasmático son significativamente más elevadas en pacientes con sepsis confirmada en comparación con donantes sanos, lo que sugiere que la magnitud de la liberación genómica microbiana está correlacionada con la severidad del proceso infeccioso y la respuesta inflamatoria del hospedador. Sin embargo, este trasfondo genómico basal impone un desafío analítico masivo,

la discriminación bioinformática entre la señal microbiana fisiológica, la contaminación ambiental (el "kit-oma") y el patógeno invasor activo.

Para resolver este enigma, (Nielsen et al., 2025) proponen el uso de estándares internos de ADN de cadena sencilla ("spike-ins") que permiten una cuantificación absoluta de la carga microbiana en genome-equivalentes por microlitro (GPM). Esta aproximación cuantitativa transforma la mNGS de una prueba cualitativa de "presencia/ausencia" en una herramienta de diagnóstico de precisión, capaz de distinguir entre señales de colonización basal y proliferación patogénica. Además, como analizan (Ahannach et al., 2021) y (Marchukov et al., 2023), el microbioma de la sangre no es estático y su composición puede verse alterada por factores como la dieta o el ayuno, lo que resalta la necesidad de protocolos de depleción de ADN humano que sean altamente selectivos para preservar la integridad de los fragmentos microbianos raros sin distorsionar el perfil taxonómico basal. La detección de señales genómicas de especies comensales cutáneas como *Staphylococcus hominis* en muestras clínicas debe ser interpretada con rigor doctoral, integrando biomarcadores de inflamación y adjudicación clínica para evitar la sobreinterpretación de resultados que podrían derivar en un uso inapropiado de antibióticos de amplio espectro (Nielsen et al., 2025).

3.1.2. Identificación de patógenos no cultivables y virus emergentes en nichos críticos

La limitación fundamental del cultivo microbiológico es su incapacidad para proporcionar un entorno de crecimiento para una vasta proporción de la diversidad microbiana, incluyendo bacterias fastidiosas, anaerobios estrictos y, por supuesto, virus. En nichos críticos como el sistema nervioso central (SNC) o el tracto respiratorio inferior, esta limitación puede derivar en una tasa de diagnóstico negativo superior al 50% en pacientes con sospecha clínica clara de infección (Nielsen et al., 2025). Como bien exponen (Q. Zhang et al., 2023) y (Guo et al., 2025), la mNGS ha irrumpido en este escenario como la única tecnología capaz de identificar la "materia oscura" del microbioma infeccioso.

En la meningitis y la encefalitis, el uso de mNGS en líquido cefalorraquídeo (LCR) ha facilitado el diagnóstico de patógenos tradicionalmente inalcanzables. (Benoit et al., 2024) y (Coll et al., 2024) reportan casos donde la secuenciación de nanoporos identificó organismos como *Leptospira borgpetersenii* o *Borrelia miyamotoi* en pacientes cuyos paneles de PCR y cultivos habían resultado negativos de manera persistente. El análisis de (Nielsen et al., 2025) destaca que la mNGS de nanoporos es particularmente eficaz para detectar virus de ADN y ARN en el SNC, logrando identificar arbovirus neuroinvasivos como el virus del Nilo

Occidental o virus emergentes como el virus Potosí que presentan una carga viral efímera y difícil de capturar mediante métodos específicos (Power et al., 2016).

La capacidad de identificación se extiende a patógenos bacterianos no cultivables que residen en entornos polimicrobianos complejos. (Govender et al., 2025) ilustran cómo la mNGS reveló la presencia de anaerobios críticos como *Bacteroides fragilis* y patógenos zoonóticos raros como *Capnocytophaga canimorsus* en pacientes con sepsis inexplicable. Estos hallazgos no solo tienen una relevancia diagnóstica, sino terapéutica inmediata, permitiendo el ajuste de regímenes antibióticos empíricos ineficaces hacia terapias dirigidas que impactan directamente en la morbilidad (Nielsen et al., 2025). Además, como analizan (Struelens et al., 2024), la vigilancia genómica en tiempo real proporcionada por la mNGS es vital para la preparación ante pandemias, permitiendo el monitoreo de saltos entre especies de virus zoonóticos y la caracterización de variantes con capacidad de escape vacunal antes de que se conviertan en amenazas para la salud pública global.

En conclusión, la taxonomía agnóstica impulsada por la secuenciación de nanoporos representa la disrupción definitiva del dogma del cultivo. Al trascender los límites de la sensibilidad de la PCR y la miopía del aislamiento microbiológico, esta tecnología nos permite comprender la infección como un evento genómico total. La integración de la mNGS en la práctica clínica, apoyada por una biofísica de translocación refinada y modelos de interpretación bioinformática cuantitativos, posiciona a la metagenómica shotgun como el nuevo estándar de oro para el diagnóstico microbiológico de precisión en el siglo XXI (Nielsen et al., 2025).

La arquitectura diagnóstica de la infectología moderna está experimentando una metamorfosis radical, impulsada por la transición de una microbiología reactiva basada en la capacidad de replicación celular en medios artificiales hacia una vigilancia genómica proactiva y omnisciente. La taxonomía agnóstica, facilitada por la secuenciación metagenómica (mNGS), permite la desarticulación del dogma del cultivo al interrogar directamente la señal iónica de los ácidos nucleicos en tránsito por nanoporos, eliminando la necesidad de objetivos moleculares predefinidos. Como bien argumentan (Nielsen et al., 2025), esta aproximación no solo acelera la identificación de patógenos en fluidos críticos, sino que redefine nuestra comprensión de la esterilidad biológica al revelar una dinámica genómica basal previamente inalcanzable para los métodos convencionales.

3.2. Cuantificación absoluta de carga viral y bacteriana mediante profundidad de lectura

La precisión en el diagnóstico de procesos infecciosos sistémicos ha evolucionado más allá de la mera identificación cualitativa para adentrarse en el ámbito de la metrología molecular cuantitativa. En la secuenciación por nanoporos, la transducción de señales electroquímicas permite una estimación de la biomasa microbiana mediante el análisis de la profundidad de lectura y la cobertura genómica. Tal como proponen (Nielsen et al., 2025), la utilización de estándares internos de ADN de cadena sencilla ("spike-ins"), integrados en el proceso de extracción, facilita una normalización bioinformática que transforma los datos de abundancia relativa en medidas de cuantificación absoluta. Esta metodología permite expresar la carga microbiana en unidades de equivalentes genómicos por microlitro (GPM), proporcionando una métrica objetiva de la intensidad del proceso infeccioso (Nielsen et al., 2025).

La biofísica subyacente a esta cuantificación absoluta radica en la estequiometría de la biblioteca genómica. Según el análisis de (Agustinho et al., 2024), la profundidad de lectura alcanzada para un taxón específico es una función directa de su concentración inicial en la muestra, siempre que se controlen los sesgos derivados de la deplesi3n de ADN humano. En escenarios de sepsis, la detección de niveles elevados de ADN microbiano libre de células (cfDNA) correlaciona estrechamente con la gravedad del fallo orgánico evaluado mediante el score SOFA, sugiriendo que la magnitud de la "DNAemia" microbiana es un biomarcador de pronóstico crítico (Nielsen et al., 2025).

Complementariamente, la tecnología de PCR digital (dPCR) ha emergido como un complemento de validaci3n para la mNGS al permitir una discriminaci3n absoluta mediante la partici3n estocástica de la muestra en miles de nanogotas. Como detallan (W. Yu et al., 2025) y (Meslier et al., 2022), mientras que la mNGS ofrece una visi3n panorámica de la composici3n taxonómica, la dPCR proporciona una sensibilidad extrema para la cuantificaci3n de dianas específicas, detectando fragmentos de pat3genos en concentraciones tan bajas que evaden el umbral de detecci3n de los métodos de cultivo (H. Yu et al., 2025). Esta sinergia tecnológica es fundamental para monitorizar la cinética de aclaramiento del pat3geno bajo presi3n antibiótica, permitiendo ajustes terapéuticos basados en la carga genómica residual en tiempo real (Nielsen et al., 2025).

3.3. Sesgos de representación genómica en bases de datos taxonómicas actuales

Uno de los desafíos epistemológicos más significativos en la metagenómica clínica es la dependencia de repositorios genómicos que presentan sesgos de representación inherentes. Las bases de datos actuales, como RefSeq o PATRIC, muestran un predominio desproporcionado de microorganismos con relevancia económica o patogénica histórica, lo que genera una "ventana de ceguera" para especies raras o linajes emergentes. Como analizan (Agustinho et al., 2024), esta asimetría informativa puede derivar en clasificaciones erróneas, donde secuencias de patógenos desconocidos son asignadas de manera forzada a sus parientes filogenéticos más cercanos presentes en la base de datos.

La integridad de estas bases de datos es cuestionada además por la presencia de contaminantes humanos infiltrados en genomas bacterianos depositados. (Meslier et al., 2022) demostraron que miles de proteínas espurias han sido catalogadas erróneamente en bases de datos taxonómicas debido a procesos de ensamblaje defectuosos que no lograron depletar adecuadamente el material genético del hospedador (Agustinho et al., 2024). Este fenómeno de contaminación biológica induce un ruido bioinformático que compromete la especificidad diagnóstica. Asimismo, como señalan (Govender et al., 2025), la transferencia horizontal de genes a través de plásmidos introduce una complejidad adicional; si una base de datos clasifica erróneamente lecturas plasmáticas como pertenecientes a un cromosoma bacteriano, la precisión de la identificación a nivel de especie se ve seriamente comprometida (Govender et al., 2025).

Para mitigar estos sesgos, se hace imperativo el uso de herramientas como el Genome Taxonomy Database (GTDB), el cual emplea una clasificación basada en genomas completos y rangos taxonómicos normalizados. Según exponen (Park et al., 2025) y (Pinzauti et al., 2025), este enfoque permite una mayor consistencia filogenética y facilita la identificación de variantes estructurales complejas que las bases de datos tradicionales suelen ignorar (Pinzauti et al., 2025). La relevancia de este análisis crítico es inmediata en la vigilancia de la resistencia antimicrobiana (AMR), donde la representación insuficiente de variantes alélicas de genes de resistencia en las bases de datos de referencia (como CARD o ResFinder) puede resultar en una subestimación del riesgo clínico (Manzoor et al., 2025).

3.4. Detección de coinfecciones complejas en el paciente crítico

La realidad biológica del paciente en estado crítico especialmente aquel con grados variables de inmunosupresión es intrínsecamente polimicrobiana, desafiando el principio de

"un patógeno, una enfermedad". La metagenómica por nanoporos destaca por su capacidad única de realizar una captura multimodal de señales genómicas fúngicas, bacterianas y virales de manera simultánea. Como ilustran (Nielsen et al., 2025), en pacientes con neutropenia febril o neoplasias hematológicas, la mNGS ha revelado coinfecciones que permanecían invisibles para el diagnóstico convencional. En un caso reportado, el análisis detectó la presencia concomitante de *Staphylococcus epidermidis* (52.4 GPM) y el virus del sarcoma de Kaposi (KSHV) en un paciente con sepsis refractaria, permitiendo una reorientación terapéutica integral (Nielsen et al., 2025).

La biofísica de la translocación de lectura larga es particularmente ventajosa para resolver estas coinfecciones. Al generar lecturas que abarcan fragmentos genómicos extensos, el sistema puede distinguir entre microorganismos que comparten regiones genéticas altamente conservadas, como los operones ribosomales, pero que difieren en su virulencia o susceptibilidad antibiótica. (Agustinho et al., 2024) argumentan que esta capacidad de "faseado metagenómico" permite separar los haplotipos de diferentes especies en una muestra compleja, facilitando la identificación de patógenos "ocultos" que suelen ser eclipsados por el crecimiento rápido de bacterias comensales en los cultivos tradicionales (Agustinho et al., 2024).

En el contexto de la neumonía severa y el distrés respiratorio, (Yin, s. f.) demuestran que la mNGS de plasma permitió identificar coinfecciones virales (como CMV o EBV) junto con hongos filamentosos como *Aspergillus fumigatus*, patógenos que a menudo coexisten en el nicho pulmonar del paciente crítico inmunocomprometido (Yin, s. f.). La detección de estas reactivaciones virales oportunistas no solo informa sobre la severidad de la inmunoparálisis del huésped, sino que permite anticipar complicaciones sistémicas que impactan drásticamente en la mortalidad (Nielsen et al., 2025).

3.5. Microbiota comensal vs. invasión patogénica: Definición de umbrales diagnósticos

La extrema sensibilidad de los secuenciadores de nanoporos impone el desafío clínico de discriminar entre la microbiota saprófita, el ADN ambiental y el agente etiológico real de la infección. La definición de umbrales diagnósticos rigurosos es el pilar que garantiza la especificidad de la prueba metagenómica. Como bien analizan (Benoit et al., 2024) y (Nielsen et al., 2025), no existe un umbral universal único; la significancia de un hallazgo genómico depende del nicho anatómico y de la naturaleza del microorganismo detectado.

Para bacterias, hongos y parásitos, la comunidad científica ha convergido hacia el uso de métricas de normalización como el ratio de lecturas por millón (RPM). (Nielsen et al., 2025)

proponen que una relación ≥ 10 entre las RPM de la muestra y las RPM de los controles internos negativos es el estándar para considerar un hallazgo como clínicamente relevante. Sin embargo, para los virus cuya carga genómica puede ser efímera debido a la rápida lisis celular o la degradación por nucleasas, el criterio se vuelve más laxo pero específico, la detección de ≥ 3 lecturas no superpuestas alineadas con un genoma viral objetivo se acepta como evidencia de presencia (Nielsen et al., 2025).

El análisis crítico de (Govender et al., 2025) subraya que estos umbrales bioinformáticos deben ser validados mediante procesos de adjudicación clínica. La presencia de señales genómicas de especies comunes de la flora cutánea, como *Staphylococcus hominis*, exige una evaluación cuidadosa de la vía de obtención de la muestra para descartar eventos de contaminación durante la venopunción (Govender et al., 2025). Además, el fenómeno del "kit-oma" el ADN microbiano residente en los reactivos de laboratorio debe ser monitorizado longitudinalmente mediante bases de datos de contaminantes que el software de análisis utiliza para el filtrado automático de señales espurias (Nielsen et al., 2025). En última instancia, la distinción entre colonización y patogenia invasiva no es solo una cuestión de recuento de lecturas, sino de una interpretación integrada que considere los biomarcadores de inflamación del hospedador y la evolución clínica del paciente (Nielsen et al., 2025).

Tabla 3

Microbiota comensal vs. invasión patogénica: definición de umbrales diagnósticos

Aspecto	Microbiota comensal	Invasión patogénica	Implicación para el diagnóstico molecular
Definición	Microorganismos que habitan normalmente determinadas superficies y mucosas sin producir enfermedad en condiciones habituales.	Presencia y proliferación de un microorganismo asociada con daño tisular, respuesta inflamatoria o manifestaciones clínicas.	La detección genética por sí sola no confirma una infección; debe interpretarse junto con el contexto clínico.
Localización	Habitualmente permanece en sitios donde forma parte del ecosistema microbiano normal.	Puede aparecer en sitios estériles o alcanzar tejidos donde su presencia no es esperada.	La localización de la muestra modifica considerablemente el significado de una lectura positiva.
Carga microbiana	Puede presentar cargas elevadas sin representar necesariamente enfermedad.	Una carga elevada puede apoyar la existencia de infección, aunque el valor diagnóstico depende del	La profundidad de lectura debe interpretarse junto con controles y métodos cuantitativos.

		microorganismo y del tipo de muestra.	
Diversidad microbiana	Suele existir una comunidad diversa y relativamente equilibrada.	Puede observarse predominio de un microorganismo específico o alteración de la estructura comunitaria.	El análisis metagenómico permite estudiar cambios en la composición de la comunidad.
Relación con el huésped	Existe una interacción generalmente compatible con la homeostasis del organismo.	La interacción puede producir daño celular, invasión, inflamación o alteración de la función tisular.	La evidencia molecular debe relacionarse con signos clínicos y biomarcadores de respuesta del huésped.
Respuesta inmunitaria	Generalmente existe tolerancia o respuesta inmunitaria controlada.	Puede producirse una respuesta inflamatoria asociada con la infección.	La combinación de datos microbiológicos y respuesta del huésped aumenta la capacidad de discriminación diagnóstica.
Daño tisular	No se espera daño asociado exclusivamente con su presencia habitual.	Puede existir lesión, inflamación o alteración funcional relacionada con la infección.	La detección del microorganismo adquiere mayor relevancia cuando existe evidencia independiente de daño.
Profundidad de lectura	Puede generar numerosas lecturas debido a su abundancia natural en determinadas muestras.	El aumento de lecturas específicas puede respaldar una mayor representación del microorganismo.	Un elevado número de lecturas no debe interpretarse automáticamente como invasión.
Cobertura genómica	Puede presentar cobertura extensa cuando el microorganismo es abundante en la muestra.	Una cobertura amplia y específica puede fortalecer la evidencia de presencia activa, dependiendo del contexto.	La cobertura debe analizarse junto con identidad, calidad y distribución de las lecturas.
Persistencia	Puede mantenerse de forma estable como parte de la microbiota.	Puede presentar incremento, desplazamiento hacia otros tejidos o persistencia asociada con enfermedad.	El análisis longitudinal puede ayudar a diferenciar colonización de infección.
Sitios anatómicos estériles	Su presencia generalmente sería inesperada en condiciones normales.	La detección en determinados sitios estériles puede tener una mayor relevancia clínica.	El sitio de obtención de la muestra constituye un criterio fundamental para establecer un umbral interpretativo.

Umbral diagnóstico	Debe evitarse considerar cualquier detección como evidencia de enfermedad.	El umbral debe establecerse considerando carga, contexto clínico, tipo de muestra y evidencia de daño.	Los puntos de corte deben validarse para cada microorganismo, muestra y plataforma analítica.
Riesgo de falso positivo clínico	Alto cuando se interpreta la presencia de ADN como infección sin considerar colonización.	Puede reducirse mediante criterios combinados de abundancia, especificidad y evidencia clínica.	La interpretación debe evitar transformar la simple detección molecular en diagnóstico automático.
Riesgo de falso negativo	Puede producirse cuando la carga es baja o existe predominio del ADN del huésped.	Puede ocurrir cuando la concentración microbiana está por debajo del límite de detección.	La profundidad de secuenciación y la depleción del ADN del huésped pueden mejorar la sensibilidad.
Interpretación mediante Nanopore	Las lecturas identificadas representan material genético presente en la muestra, pero no necesariamente infección activa.	Las lecturas específicas, especialmente cuando se acompañan de otros indicadores, pueden aportar evidencia de infección.	La ventaja de la lectura en tiempo real debe complementarse con algoritmos y criterios clínicos de interpretación.
Confirmación diagnóstica	Generalmente requiere correlación con el estado clínico y microbiológico.	Puede requerir pruebas confirmatorias, cultivo, PCR específica u otras evidencias según el caso.	La metagenómica debe integrarse dentro de un proceso diagnóstico multimodal.

Nota: Elaboración propia a partir de y (Marchukov et al., 2023).

La diferenciación entre la microbiota comensal y la invasión de patógenos representa uno de los principales desafíos en el ámbito de la metagenómica clínica. Esto ocurre porque limitarse a detectar el material genético de un microorganismo no es suficiente para validar la presencia de una infección.

Un microorganismo puede hallarse en grandes cantidades como parte de la microbiota habitual, pero si se encuentra en un tejido o área donde no debería estar, su presencia podría tener un significado clínico muy distinto. Por ello, los criterios diagnósticos no deberían fundamentarse únicamente en un número fijo de lecturas, sino que es necesario tener en cuenta la profundidad y cobertura de la secuenciación, la carga microbiana, la ubicación anatómica, las características de la muestra, la reacción del hospedador y las manifestaciones clínicas.

Con respecto a Nanopore, esta interpretación resulta particularmente importante, ya que su capacidad para generar lecturas rápidamente puede permitir la identificación de microorganismos comensales, colonizadores y posibles patógenos en una única muestra. Por

tanto, es esencial evolucionar de una lógica de “presencia o ausencia” a una evaluación más detallada que establezca si la señal molecular indica colonización, desbalance microbiano o invasión patogénica.

Así, la determinación de los umbrales diagnósticos debe basarse en criterios validados y específicos para cada microorganismo, tipo de muestra y contexto clínico, lo que contribuirá a disminuir tanto el riesgo de sobrediagnóstico como la posibilidad de no detectar una infección real.

En conclusión, la taxonomía agnóstica impulsada por la secuenciación de nanoporos representa la culminación de un cambio de paradigma en el diagnóstico molecular. Al integrar cuantificación absoluta, análisis crítico de bases de datos, resolución de coinfecciones y umbrales de decisión validados, la metagenómica shotgun se posiciona como la herramienta definitiva para una medicina de precisión que trasciende las limitaciones históricas del cultivo microbiológico.

La microbiología diagnóstica ha operado durante más de un siglo bajo la hegemonía del cultivo purificado, una metodología que, si bien es el estándar de oro histórico, impone una restricción biológica sustancial, la obligatoriedad de la viabilidad celular y la replicación *in vitro*. La irrupción de la secuenciación metagenómica (mNGS) de lectura larga ha provocado una desarticulación de este paradigma, instaurando una "taxonomía agnóstica" que no discrimina entre microorganismos cultivables y no cultivables. Como bien señalan (Nielsen et al., 2025), esta transición permite el interrogatorio directo de la señal genómica total, capturando la complejidad de los ecosistemas infecciosos sin los sesgos de enriquecimiento selectivo inherentes a los medios de cultivo tradicionales.

3.5.1. El papel de la metagenómica en la redefinición de los postulados de Koch

La relación causal entre un agente patógeno y un cuadro clínico, fundamentada históricamente en los postulados de Koch, exige el aislamiento del microorganismo en un cultivo puro y su posterior inoculación para reproducir la patología. Sin embargo, la biofísica de la metagenómica moderna propone una redefinición molecular de estos criterios. Al emplear biosensores de nanoporos que detectan la señal iónica de fragmentos genómicos directamente de matrices clínicas, la mNGS permite establecer una asociación estadística y biológica inequívoca entre la presencia de un patógeno y el estado inflamatorio del hospedador, incluso en ausencia de aislamiento físico (Nielsen et al., 2025).

Esta "causalidad genómica" se apoya en la cuantificación absoluta de la biomasa microbiana. Tal como postulan (Nielsen et al., 2025) y (Parhofer et al., 2026), la correlación entre la carga microbiana libre de células (ccfDNA) y los biomarcadores de severidad orgánica, como el score SOFA, sugiere que la detección genómica no es un evento fortuito, sino un reflejo fiel de la dinámica de invasión sistémica. En este nuevo marco epistemológico, el primer postulado de Koch (presencia constante en la enfermedad) se satisface mediante la profundidad de lectura metagenómica, mientras que el segundo postulado (aislamiento) es sustituido por la reconstrucción bioinformática de genomas completos a partir de metagenomas (MAGs), permitiendo una caracterización de linajes con una resolución que el cultivo jamás podría alcanzar (Agustinho et al., 2024). La relevancia clínica de esta redefinición es inmediata en el diagnóstico de enfermedades idiopáticas, donde la detección de firmas genómicas de patógenos fastidiosos permite una adjudicación diagnóstica basada en evidencia molecular robusta (Nielsen et al., 2025).

3.5.2. Detección de parásitos y microeucariotas mediante secuenciación de lectura larga

La detección de parásitos y otros microorganismos eucariotas en fluidos clínicos representa uno de los desafíos más complejos para la metagenómica de lectura corta, debido a la magnitud de sus genomas y la abundancia de regiones repetitivas que confunden los algoritmos de alineamiento convencional. No obstante, la biofísica de la secuenciación de lectura larga (LRS), facilitada por plataformas como Oxford Nanopore, ha transformado esta limitación en una ventaja analítica. Al generar lecturas que superan las kilobases de longitud, el sistema puede atravesar regiones de alta complejidad estructural, permitiendo una discriminación taxonómica precisa entre especies de parásitos filogenéticamente cercanas.

Como bien analizan (Milburn et al., 2024) y (H. Yu et al., 2025), en infecciones del sistema nervioso central, la mNGS de nanoporos ha demostrado una sensibilidad superior para identificar protozoos como *Toxoplasma gondii* o parásitos emergentes que suelen evadir los paneles de PCR específicos. La mecánica de esta detección se fundamenta en la capacidad de los poros de la serie R10 para resolver variantes de un solo nucleótido y variaciones estructurales (SVs) dentro de los operones ribosomales eucariotas. (Agustinho et al., 2024) destacan que el uso de lecturas ultra-largas facilita el "faseado" metagenómico, permitiendo separar el material genético del hospedador humano del de los microeucariotas invasores, incluso cuando la biomasa del parásito es marginal (Milburn et al., 2024). Esta capacidad de interrogar genomas complejos de forma agnóstica es vital para la resolución de cuadros de

meningitis y encefalitis de etiología desconocida, donde la demora en la identificación del parásito se traduce en secuelas neurológicas irreversibles (Milburn et al., 2024).

3.6. Integración de datos morfológicos clásicos con el fenotipado genómico

La integración de la morfología microscópica tradicional con el perfilado genómico de alta resolución constituye la frontera actual del diagnóstico microbiológico integrado. Históricamente, la identificación microbiana ha dependido de la observación de la tinción de Gram y las características de crecimiento colonial, procesos que, aunque informativos, son inherentemente subjetivos y tardíos. La metagenómica de nanoporos permite realizar un "fenotipado genómico" casi en tiempo real, donde la identidad del microorganismo se deduce de su firma eléctrica antes de que sea visible en un microscopio o placa de agar.

Figura 4

Influencia del plegamiento secundario de ARN en la secuencia directa



Nota: Elaboración propia a partir de (Govender et al., 2025),

Tal como ilustran (Govender et al., 2025), el uso de flujos de trabajo directos desde hemocultivos positivos permite la identificación de especies en menos de dos horas, con una precisión del 98% que supera los límites de la espectrometría de masas MALDI-TOF. La verdadera disrupción radica en la capacidad de predecir el fenotipo de resistencia

antimicrobiana (AMR) directamente de la secuencia. Como exponen (Manzoor et al., 2025) y (Meslier et al., 2022), la presencia de genes de resistencia específicos como *mecA* para MRSA o *blaKPC* para carbapenemasas detectados mediante modelos de aprendizaje profundo en nanoporos, presenta una concordancia superior al 90% con las pruebas de susceptibilidad fenotípicas (AST) (Govender et al., 2025).

La sinergia permite que el clínico integre la morfología preliminar (ej. "cocos grampositivos en racimos") con una confirmación genómica inmediata y un perfil de susceptibilidad predictivo, permitiendo una desescalada antibiótica dirigida en una ventana terapéutica críticamente temprana (Govender et al., 2025).

3.7. Controversias actuales, análisis crítico de la evidencia y perspectivas futuras

A pesar de su innegable potencial, la adopción sistémica de la metagenómica agnóstica se enfrenta a controversias técnicas y económicas significativas. La principal crítica de la comunidad médica internacional reside en la falta de estandarización de los umbrales diagnósticos y la influencia del "kit-oma" o ADN ambiental en la interpretación de los resultados. Como bien argumentan (Albitar et al., 2023) y (Nielsen et al., 2025), la extrema sensibilidad de los secuenciadores de nanoporos puede derivar en la detección de trazas de ADN que no tienen relevancia clínica activa, generando un ruido bioinformático que exige procesos de adjudicación clínica rigurosos para evitar el sobretratamiento antimicrobiano.

El análisis crítico de la evidencia, según (Govender et al., 2025) y (Power et al., 2016), revela que aunque la mNGS reduce drásticamente el tiempo de identificación, aún son necesarios ensayos clínicos controlados aleatorizados (RCTs) que demuestren que esta rapidez diagnóstica se traduce inequívocamente en una reducción de la mortalidad a largo plazo. Además, el costo operativo de las plataformas de alto rendimiento sigue siendo una barrera para su implementación en entornos de recursos limitados, donde el cultivo sigue siendo el pilar fundamental (Milburn et al., 2024).

Las perspectivas futuras se centran en la democratización del diagnóstico mediante dispositivos portátiles de bajo costo y la integración de la inteligencia artificial (IA) "confiable" para la interpretación automatizada de perfiles metagenómicos complejos. (Goktas & Grzybowski, 2025) y (Kardjadj, 2025) anticipan que el desarrollo de biosensores integrados sobre chips CMOS, combinados con algoritmos de aprendizaje profundo que operen localmente (*edge computing*), permitirá la transición de la mNGS desde los laboratorios centralizados hacia el punto de atención (*point-of-care*). Asimismo, la evolución hacia la

proteómica de nanoporos para la detección de aminoácidos individuales promete una resolución diagnóstica multimodal que redefinirá nuestra comprensión de la fisiopatología de las enfermedades infecciosas en la era de la medicina de precisión (Van Dijk et al., 2023).

En conclusión, la taxonomía agnóstica impulsada por la secuenciación de nanoporos representa el fin de la era de la dependencia del cultivo. Al redefinir los postulados de Koch en términos genómicos, resolver la identidad de parásitos complejos y fusionar los datos morfológicos con el fenotipado molecular, esta tecnología se posiciona como el nuevo estándar de oro para la vigilancia epidemiológica y el diagnóstico clínico global en el siglo XXI (Nielsen et al., 2025).

Capítulo IV

Basecalling de Alta Fidelidad y Procesamiento de Señal mediante Redes Neuronales

La transición de la señal analógica cruda, generada por el tránsito de biopolímeros a través de un poro nanoscópico, hacia un código digital legible constituye el núcleo computacional de la metagenómica moderna. En la tecnología de nanoporos, este proceso, denominado *basecalling*, no es una simple traducción lineal, sino una inferencia probabilística de alta complejidad que debe resolver las sutiles fluctuaciones de la corriente iónica medidas en la escala de los picoamperios. Como bien exponen (Agustinho et al., 2024), la eficacia de esta etapa define la utilidad clínica de la secuenciación, puesto que la precisión en la identificación de especies y la detección de variantes de resistencia dependen directamente de la fidelidad con la que el software interpreta los eventos de oclusión del sensor.

4.1. Arquitecturas de redes neuronales recurrentes para la traducción de corriente a bases

El fundamento biofísico de la secuenciación de nanoporos radica en la monitorización continua de un flujo iónico a través de una membrana de alta resistencia. Cuando una hebra de ácido nucleico atraviesa el poro, ocluye parcialmente el canal, provocando caídas de corriente proporcionales al volumen estérico y la densidad de carga de los nucleótidos presentes en la zona de detección. Esta señal cruda, conocida como "garabato" o *squiggle*, presenta una naturaleza intrínsecamente secuencial y temporal, donde el estado actual de la señal está influenciado por las bases que acaban de transitar y por aquellas que están por entrar.

Para abordar esta interdependencia temporal, la bioinformática clínica ha adoptado las arquitecturas de redes neuronales recurrentes (RNN). Según detallan (Van Dijk et al., 2023), a diferencia de los modelos de Markov ocultos (HMM) utilizados en las primeras iteraciones de la tecnología, las RNN poseen capas de memoria interna que permiten capturar dependencias de largo alcance dentro de la señal eléctrica. Esta capacidad es fundamental para corregir el ruido derivado de la velocidad variable de la helicasa, la proteína motora que regula el paso del ADN. Como analizan (Meng et al., 2025) en su estudio pionero sobre DeepNano, la implementación de capas bidireccionales de memoria de corto y largo plazo (Bi-LSTM) permite que el algoritmo procese la información tanto hacia adelante como hacia atrás, optimizando la asignación de probabilidades para cada nucleótido (Van Dijk et al., 2023).

La evolución de estas arquitecturas ha permitido el desarrollo de herramientas de vanguardia como Guppy y, más recientemente, Dorado. Tal como argumentan (Agustinho

et al., 2024), Dorado representa un hito en la eficiencia computacional al integrar modelos de aprendizaje profundo optimizados para procesadores gráficos (GPU), lo que facilita un *basecalling* en tiempo real con una latencia mínima. Esta agilidad es crítica en el diagnóstico de patologías agudas, como la sepsis o la meningitis bacteriana, donde cada minuto de demora en la identificación del patógeno incrementa el riesgo de secuelas permanentes o muerte (Nielsen et al., 2025). Además, la flexibilidad de estas RNN permite al clínico seleccionar entre diferentes modelos de precisión (FAST, High-Accuracy o Super-Accuracy), equilibrando la necesidad de resultados inmediatos con la exigencia de una fidelidad diagnóstica superior (Agustinho et al., 2024).

La relevancia de una traducción precisa de la corriente a bases trasciende la taxonomía. En la vigilancia genómica de la resistencia antimicrobiana (AMR), un error de *basecalling* en una región codificante podría derivar en la omisión de una mutación puntual crítica, como las SNVs en los genes *gyrA* o *parC* que confieren resistencia a las fluoroquinolonas (Manzoor et al., 2025). Por ello, el refinamiento de las RNN es un proceso de optimización continua que busca alcanzar puntuaciones de calidad Phred superiores a Q20 (precisión del 99%), cerrando la brecha histórica que separaba a la tecnología de nanoporos de las plataformas de lectura corta (Van Dijk et al., 2023).

4.2. Modelos de aprendizaje profundo para la corrección de errores en homopolímeros

Uno de los desafíos más persistentes en la biofísica de nanoporos ha sido la resolución exacta de las regiones de homopolímeros, es decir, secuencias compuestas por la repetición del mismo nucleótido (ej. AAAAA). En estas zonas, el volumen estérico y la firma eléctrica permanecen constantes mientras la molécula transita por la constricción del poro, lo que genera una señal de corriente en meseta difícil de segmentar. Históricamente, esto resultaba en errores de inserción y delección (indels), donde el secuenciador no lograba determinar con exactitud el número de bases idénticas presentes (Van Dijk et al., 2023).

Para mitigar este fenómeno, la ingeniería de sistemas ha convertido en una solución dual, la mejora del hardware de los poros y la sofisticación de los modelos de aprendizaje profundo. Como explican (Van Dijk et al., 2023) y (Agustinho et al., 2024), la introducción de la serie de poros R10 ha sido determinante. Estos sensores poseen una geometría con dos zonas de lectura distintas, lo que permite una detección redundante de la molécula. Cuando un homopolímero atraviesa el poro R10, las dos zonas de detección capturan firmas eléctricas ligeramente desfasadas, proporcionando una información espacial que los modelos de

aprendizaje profundo pueden explotar para contar las bases con precisión milimétrica (Van Dijk et al., 2023).

Tabla 4

Principales elementos del aprendizaje profundo aplicado a la corrección de homopolímeros

Elemento	Descripción	Función en la corrección	Importancia clínica
Señal eléctrica	Variación de corriente producida cuando el ácido nucleico atraviesa el nanoporo.	Constituye la información primaria utilizada por los modelos para inferir la secuencia.	Su adecuada interpretación condiciona la precisión del diagnóstico molecular.
Homopolímero	Región formada por la repetición consecutiva de un mismo nucleótido, como AAAAA o GGGGG.	Representa una región donde puede ser difícil determinar el número exacto de bases.	Los errores pueden afectar la identificación de variantes y características genéticas microbianas.
Basecalling	Conversión computacional de la señal eléctrica en una secuencia de nucleótidos.	Genera la lectura inicial sobre la cual pueden actuar los algoritmos de corrección.	Constituye una etapa esencial para obtener información genética interpretable.
Aprendizaje profundo	Uso de redes neuronales capaces de aprender patrones complejos a partir de grandes conjuntos de datos.	Identifica patrones asociados con errores de secuenciación y propone una secuencia corregida.	Permite aumentar la confiabilidad de los datos utilizados en análisis clínicos.
Redes neuronales	Modelos computacionales entrenados para reconocer relaciones entre señales y secuencias.	Analizan información contextual y características de las señales para mejorar la inferencia.	Favorecen una identificación molecular más precisa.
Errores de inserción	Incorporación de una base que no corresponde a la secuencia original.	El algoritmo identifica patrones que sugieren nucleótidos adicionales.	Su corrección evita alteraciones artificiales en la secuencia genética.
Errores de delección	Omisión de una o más bases durante la lectura.	El modelo detecta posibles bases ausentes y reconstruye la secuencia.	Es especialmente importante en regiones repetitivas y análisis de variantes.
Errores de sustitución	Una base es interpretada como otra diferente.	El modelo compara patrones de señal y contexto para seleccionar la base más probable.	Reduce el riesgo de falsos cambios genéticos.
Contexto de secuencia	Información correspondiente a las bases que rodean la región analizada.	Ayuda al modelo a diferenciar patrones ambiguos de homopolímeros.	Mejora la interpretación de regiones genómicas complejas.
Entrenamiento	Proceso mediante el cual el modelo aprende utilizando secuencias y	Permite reconocer patrones de error y	La calidad y diversidad de los datos de

	señales previamente conocidas.	establecer predicciones más precisas.	entrenamiento influyen en el desempeño.
Corrección de lecturas	Proceso posterior al <i>basecalling</i> destinado a reducir errores.	Genera una secuencia con mayor exactitud para análisis posteriores.	Mejora la confiabilidad de la identificación taxonómica y funcional.
Validación	Comparación de las secuencias corregidas con referencias o métodos independientes.	Determina la precisión real del modelo.	Es necesaria antes de utilizar los resultados en aplicaciones clínicas.
Resistencia antimicrobiana	Información genética asociada con genes o mutaciones que confieren resistencia.	La corrección precisa evita errores en la identificación de genes y variantes relevantes.	Puede contribuir a una caracterización molecular más confiable de microorganismos.

Nota: Elaboración propia a partir de (Govender et al., 2025),

La utilización de modelos de aprendizaje profundo para rectificar fallas en homopolímeros representa un progreso notable en el análisis de datos de secuenciación Nanopore. Esto hace posible que, mediante herramientas informáticas, se supere una limitación fundamental relacionada con la naturaleza de la señal eléctrica. Cuando múltiples nucleótidos iguales pasan consecutivamente por el nanoporo, puede ser difícil diferenciar entre una repetición de cierta longitud y otra que sea ligeramente más larga o más corta. Es aquí donde los algoritmos de aprendizaje profundo son útiles, ayudando a reducir esta dificultad al identificar patrones tanto en la señal como en el contexto de la secuencia.

De esta forma, el procedimiento ya no se basa solo en una lectura directa de la corriente, sino que integra modelos que pueden deducir la secuencia más probable a partir de varias características. En el campo de la metagenómica clínica, esta mejora es esencial, ya que una mayor exactitud en las áreas repetitivas optimiza la caracterización de genomas microbianos, la identificación de variantes y el análisis de genes funcionales, incluyendo aquellos relacionados con la resistencia a los antimicrobianos. No obstante, es fundamental considerar que la corrección informática no elimina completamente la posibilidad de errores, por lo que es necesario verificar los resultados y llevar a cabo controles de calidad antes de usarlos como evidencia.

Complementariamente, los algoritmos de corrección basados en redes neuronales convolucionales (CNN) y transformadores (*transformers*) han revolucionado la interpretación de estas regiones. Según el análisis crítico de (Agustinho et al., 2024), modelos como Remora están diseñados para identificar no solo las cuatro bases canónicas en regiones repetitivas, sino también modificaciones epigenéticas simultáneamente, utilizando la varianza de la señal eléctrica como un biomarcador de la identidad nucleotídica. La química V14 de Oxford Nanopore, combinada con el motor proteico optimizado, ha estabilizado la cinética de translocación, reduciendo los eventos de deslizamiento enzimático que solían exacerbar el problema de los homopolímeros (Van Dijk et al., 2023).

La precisión en la resolución de homopolímeros tiene un impacto directo en la reconstrucción de genomas completos a partir de metagenomas (MAGs). Como señalan (Meng et al., 2025) y (Agustinho et al., 2024), la capacidad de ensamblar secuencias continuas y sin brechas (*gaps*) depende de la fidelidad del *basecalling* en regiones de baja complejidad genética. En entornos clínicos, esto permite distinguir entre cepas de patógenos estrechamente relacionadas que solo difieren en la longitud de ciertos tractos repetitivos asociados con factores de virulencia o evasión inmune (Nielsen et al., 2025). Asimismo, esta fidelidad es esencial para el mapeo del resistoma, ya que muchos genes de resistencia están flanqueados por elementos genéticos móviles que contienen secuencias repetitivas, cuya resolución es vital para entender la dinámica de transmisión horizontal en brotes hospitalarios (Agustinho et al., 2024).

En conclusión, la bioinformática de nanoporos ha transitado desde algoritmos de procesamiento de señal rudimentarios hacia ecosistemas de aprendizaje profundo altamente sofisticados. La integración de arquitecturas RNN para la traducción de corriente y modelos avanzados para la corrección de errores en homopolímeros constituye el cimiento sobre el cual se construye la metagenómica clínica de precisión. Esta sinergia entre biotecnología y computación de alto rendimiento permite que la secuenciación de molécula única proporcione datos genómicos con una exactitud que redefine los estándares de la medicina diagnóstica contemporánea (Nielsen et al., 2025).

4.3. Bioinformática de la identificación taxonómica y procesamiento de datos en el punto de atención

La arquitectura bioinformática contemporánea ha evolucionado para transformar la señal electroquímica de los nanoporos en decisiones clínicas inmediatas. Este proceso demanda una infraestructura que equilibre la velocidad de procesamiento con la sofisticación algorítmica, permitiendo que la metagenómica shotgun transite de ser una herramienta de laboratorio centralizado hacia una plataforma diagnóstica ubicua. La optimización de la inferencia computacional, el uso de estructuras de datos compactas como los *k*-mers y la implementación de técnicas de filtrado activo en el sensor representan los pilares de esta revolución digital.

Tabla 5

Bioinformática de la identificación taxonómica y procesamiento de datos

Etapas del procesamiento	Proceso principal	Datos obtenidos	Propósito dentro del diagnóstico	Aplicación en el punto de atención (Point-of-Care)
---------------------------------	--------------------------	------------------------	---	---

1. Adquisición de datos	El secuenciador Nanopore registra las señales eléctricas producidas durante el paso del ADN o ARN por los nanoporos.	Señales eléctricas crudas y datos de secuenciación en tiempo real.	Obtener la información molecular inicial de la muestra.	Permite comenzar el análisis inmediatamente después de iniciar la secuenciación, sin esperar a completar toda la corrida.
2. Basecalling	Los algoritmos convierten las señales eléctricas en secuencias de nucleótidos mediante modelos computacionales.	Lecturas de ADN o ARN en formato digital.	Transformar una señal física en información genética interpretable.	Puede ejecutarse de manera local o mediante sistemas informáticos próximos al lugar donde se realiza el diagnóstico.
3. Control de calidad	Se evalúan longitud, calidad, rendimiento y características de las lecturas obtenidas.	Lecturas filtradas y clasificadas según su calidad.	Reducir errores y evitar que datos deficientes interfieran con la identificación microbiana.	Facilita decisiones rápidas sobre la suficiencia de los datos para continuar el análisis.
4. Clasificación taxonómica	Las secuencias se comparan con bases de datos genómicas para determinar su posible origen taxonómico.	Identificación de bacterias, hongos, virus y otros microorganismos.	Determinar qué microorganismos están presentes en la muestra.	Permite generar una primera identificación durante la propia secuenciación.
5. Análisis de abundancia	Se cuantifican y comparan las lecturas asignadas a los diferentes microorganismos.	Proporción y profundidad de lectura por taxón.	Ayudar a diferenciar microorganismos predominantes de señales de baja representación.	Puede contribuir a priorizar los agentes potencialmente relevantes para la situación clínica.
6. Análisis funcional	Se investigan genes y características funcionales asociadas con los microorganismos identificados.	Genes de resistencia antimicrobiana, factores de virulencia y funciones metabólicas, entre otros.	Complementar la identificación taxonómica con información biológica relevante.	Puede aportar información adicional para orientar la evaluación de una infección y sus posibles mecanismos de resistencia.
7. Integración clínica	Los resultados bioinformáticos se relacionan con el tipo de muestra,	Evidencia microbiológica contextualizada.	Evitar interpretar la detección molecular de manera aislada.	Favorece una interpretación rápida y contextualizada

	antecedentes, signos clínicos y otros resultados de laboratorio.			en escenarios asistenciales.
8. Reporte clínico	Los resultados relevantes se presentan de forma resumida y comprensible para el profesional sanitario.	Informe microbiológico y molecular.	Convertir los datos de secuenciación en información útil para la toma de decisiones.	Permite acortar el intervalo entre la obtención de la muestra y la disponibilidad de información diagnóstica.
9. Retroalimentación y vigilancia	Los resultados pueden incorporarse a sistemas de vigilancia y análisis epidemiológico.	Datos agregados sobre microorganismos, resistencia y distribución de casos.	Identificar patrones, brotes y cambios epidemiológicos.	Especialmente útil en UCI, hospitales, laboratorios de vigilancia y regiones con infraestructura limitada.

Nota: Elaboración propia a partir de (Nielsen et al., 2025).

La bioinformática es esencial para la determinación taxonómica y el manejo de datos en el lugar de atención, ya que convierte las señales que produce la secuenciación Nanopore en información sobre microorganismos, lo que resulta muy valioso para el diagnóstico. El proceso comienza con la captura de señales eléctricas, seguido por el basecalling, en el que estas señales se traducen en secuencias de nucleótidos. A continuación, se implementan pasos de control de calidad, clasificación taxonómica, análisis de abundancia y caracterización funcional, culminando en la elaboración de un informe clínico.

En la estructura es vital, ya que cada fase cumple una función específica y juntas forman una cadena de procesamiento donde la velocidad en la generación de datos necesita estar alineada con algoritmos que puedan analizarlos e interpretarlos de manera eficiente. La noción de Point-of-Care (PoC) tiene particular relevancia en este contexto, ya que busca llevar el análisis molecular al lugar donde la información es verdaderamente necesaria, reduciendo la dependencia de laboratorios centrales y facilitando respuestas más rápidas. Por ejemplo, en una unidad de cuidados intensivos, el análisis metagenómico puede ser decisivo para identificar rápidamente los microorganismos presentes en muestras de pacientes con infecciones severas.

En el contexto de la vigilancia epidemiológica, ayuda a detectar y monitorear agentes infecciosos; durante brotes en hospitales, posibilita la comparación de perfiles genéticos y respalda la investigación de posibles vías de transmisión. Además, en regiones alejadas o con poca infraestructura, las plataformas de secuenciación portátiles pueden ofrecer capacidades

de análisis molecular en sitios donde hay un escaso acceso a laboratorios especializados. Por lo tanto, el verdadero valor de esta estructura bioinformática no se limita a identificar un microorganismo, sino que se centra en crear un flujo integrado que va desde la detección hasta la interpretación de los datos.

4.3.1. Inferencia computacional en dispositivos locales (Edge Computing) frente a la nube

La dicotomía entre el procesamiento local y el análisis en la nube define la agilidad del diagnóstico genómico. La inferencia en dispositivos locales, o *edge computing*, se fundamenta en la integración de unidades de procesamiento gráfico (GPU) y circuitos integrados de aplicación específica (ASIC) directamente en el hardware de secuenciación, como ocurre en las plataformas GridION y PromethION. Como bien analizan (Agustinho et al., 2024), esta configuración permite la ejecución de modelos de *basecalling* de alta fidelidad, como Dorado, que operan con una latencia mínima al procesar la señal de corriente en el mismo sitio donde se genera.

Desde una perspectiva clínica, el *edge computing* es el garante de la autonomía diagnóstica en escenarios de vigilancia epidemiológica de campo o en unidades de cuidados críticos. Al eliminar la dependencia de la transferencia masiva de datos hacia servidores remotos, se mitigan los riesgos asociados a la inestabilidad de la conexión a internet y se preserva la confidencialidad de la información genética del paciente en un entorno local (Agustinho et al., 2024). Además, herramientas como Dorado están optimizadas para realizar el llamado de bases en tiempo real, lo que facilita que la identificación taxonómica comience apenas minutos después de iniciada la corrida, una característica vital para el manejo de patologías de progresión fulminante como la sepsis bacteriana (Nielsen et al., 2025).

En contraste, las soluciones basadas en la nube, como BugSeq, ofrecen una escalabilidad y capacidad de almacenamiento que superan las restricciones físicas del hardware local. Según describen (Meng et al., 2025) y (Agustinho et al., 2024), estas plataformas permiten el acceso a bases de datos taxonómicas y de resistencia antimicrobiana (AMR) exhaustivas y constantemente actualizadas, las cuales serían imposibles de alojar en dispositivos portátiles. La computación en la nube facilita la implementación de flujos de trabajo bioinformáticos complejos que requieren una memoria RAM masiva para el ensamblaje *de novo* de metagenomas, permitiendo la reconstrucción de genomas completos a partir de fragmentos ultra-largos (Van Dijk et al., 2023). Por tanto, la elección entre una u otra modalidad no es excluyente, sino complementaria, el *edge computing* prioriza la identificación

rápida y el triaje clínico inicial, mientras que la nube permite un análisis genómico profundo y una vigilancia epidemiológica a escala global (Struelens et al., 2024).

4.3.2. Algoritmos de alineamiento k -mer de alta velocidad para identificación taxonómica

La identificación de microorganismos a partir de lecturas metagenómicas requiere métodos de clasificación que puedan procesar millones de fragmentos de ADN con una eficiencia temporal extrema. Los algoritmos basados en k -mers subsecuencias de longitud fija k han emergido como el estándar de oro para esta tarea. El exponente más robusto de esta tecnología es Kraken 2, el cual utiliza un índice de k -mers asignados al ancestro común más bajo (LCA) de una jerarquía taxonómica. Como bien explican (Denk-Lobnig & Wood, 2023) y (Nielsen et al., 2025), esta arquitectura permite una clasificación ultrarrápida al evitar el alineamiento base a base, transformando la búsqueda taxonómica en una consulta de tabla de hash de alta velocidad.

La mecánica de Kraken 2 se complementa con Bracken, un algoritmo diseñado para la estimación precisa de la abundancia de especies. (Z. Lu et al., 2025) y (Govender et al., 2025) señalan que Kraken 2 puede presentar limitaciones en la resolución de niveles taxonómicos inferiores debido a que muchos k -mers son compartidos entre especies estrechamente relacionadas, resultando en lecturas asignadas a niveles de género o familia. Bracken resuelve esta ambigüedad mediante una corrección bayesiana que redistribuye las lecturas desde el nivel LCA hacia el nivel de especie, basándose en la probabilidad de que una lectura pertenezca a un genoma específico dada la distribución de k -mers observada (Nielsen et al., 2025).

Para la secuenciación de lectura larga, el uso de k -mers enfrenta el desafío de la tasa de error intrínseca de los nanoporos. Para solventar esto, se han desarrollado herramientas como CDKAM, que emplea coincidencias de k -mers inexactas para compensar las discrepancias entre la lectura y la referencia. (Agustinho et al., 2024) y (Ardila et al., 2023) destacan que esta flexibilidad algorítmica permite mantener una alta sensibilidad diagnóstica sin comprometer la velocidad de procesamiento. La relevancia clínica de estos algoritmos es inmediata, en el estudio de (Govender et al., 2025), el uso de Kraken 2 y Bracken permitió la identificación exacta de patógenos en hemocultivos con una concordancia del 100% con los métodos de cultivo, pero reduciendo el tiempo de identificación a menos de dos horas, facilitando una intervención terapéutica oportuna que impacta directamente en la supervivencia (Govender et al., 2025).

4.3.3. Uso de MinHash y bocetos genómicos para la comparación rápida de metagenomas

En la era de los grandes datos genómicos, la comparación de perfiles metagenómicos completos exige técnicas de reducción de dimensionalidad que preserven la identidad biológica de las muestras. La implementación de algoritmos de MinHash permite la creación de "bocetos genómicos" (*genomic sketches*), que son representaciones compactas y probabilísticas de la composición de nucleótidos de un metagenoma. Como analizan (Agustinho et al., 2024) y (Ardila et al., 2023), el uso de herramientas como Mash permite estimar la distancia de Jaccard entre dos muestras o genomas de manera casi instantánea, facilitando la organización de grandes repositorios de datos y la identificación de similitudes genómicas sin recurrir al alineamiento exhaustivo.

La biofísica de los bocetos genómicos es fundamental para la validación de genomas ensamblados desde metagenomas (MAGs). Según explican (Agustinho et al., 2024) y (Van Dijk et al., 2023), la comparación de los bocetos de las lecturas crudas frente a los ensamblajes finales permite detectar sesgos de representación o contaminaciones infiltradas, asegurando que la reconstrucción genómica sea fiel a la muestra original. En el ámbito de la vigilancia genómica, esta técnica facilita el "faseado" de cepas y la detección de elementos genéticos móviles altamente conservados que podrían portar genes de resistencia antimicrobiana (Agustinho et al., 2024).

Además, el uso de bocetos genómicos es vital para la navegación en bases de datos masivas. (S. Casimiro-Soriguer et al., 2025) y (Struelens et al., 2024) destacan que, en el contexto de una vigilancia epidemiológica regional, la capacidad de comparar rápidamente miles de genomas virales o bacterianos mediante firmas de MinHash permite rastrear la dinámica de transmisión de brotes intrahospitalarios en tiempo real. Esta agilidad analítica transforma la metagenómica shotgun en un sistema de alerta temprana, capaz de identificar la emergencia de linajes hipervirulentos o variantes con capacidad de escape inmunológico antes de que se propaguen sistémicamente (Struelens et al., 2024).

4.4. Filtrado en tiempo real de lecturas del huésped mediante *Read-until*

Quizás la innovación bioinformática más disruptiva en la tecnología de nanoporos es la capacidad de realizar un filtrado molecular activo durante el proceso mismo de secuenciación. Esta técnica, conocida como muestreo adaptativo (*adaptive sampling*) o tecnología *Read-until*, permite que el secuenciador "decida" en milisegundos si continúa leyendo una molécula o si la descarta. Como detallan (Agustinho et al., 2024) y (Marchukov et al., 2023), el mecanismo se

basa en el mapeo en tiempo real de los primeros 400 a 600 nucleótidos que atraviesan el poro; si el software identifica que la secuencia pertenece al genoma del hospedador humano, instruye al sensor CMOS para que invierta la polaridad del voltaje, expulsando físicamente la hebra del nanoporo.

Este mecanismo de "deplesi3n digital" revoluciona la biofísica de la captura en muestras de baja biomasa. En fluidos como el líquido cefalorraquídeo o el plasma, donde el ADN microbiano es marginal frente al humano, el *Read-until* libera los poros saturados por el ADN del huésped, permitiéndoles capturar nuevas moléculas de manera inmediata. (Agustinho et al., 2024) y (Payne et al., 2024) han demostrado que esta técnica puede incrementar la cobertura de los genomas de patógenos raros en varios órdenes de magnitud, facilitando el diagnóstico de infecciones virales y bacterianas que de otro modo serían indetectables (Nielsen et al., 2025).

La relevancia clínica del *Read-until* se manifiesta en su capacidad para actuar como un filtro inteligente y programable. Como argumentan (Nielsen et al., 2025) y (Ahannach et al., 2021), esta tecnología permite enriquecer de manera simultánea múltiples dianas de interés, como paneles de genes de resistencia o virus respiratorios emergentes, sin la necesidad de protocolos de captura híbrida costosos y laboriosos. Al integrar el filtrado de lecturas del huésped con el análisis taxonómico de alta velocidad, la secuenciación de nanoporos se consolida como una plataforma de diagnóstico de precisión capaz de operar en los límites de la sensibilidad molecular, proporcionando datos genómicos completos en ventanas temporales críticamente tempranas para la supervivencia del paciente (Nielsen et al., 2025).

En conclusión, la bioinformática clínica aplicada a la secuenciación de nanoporos integra una orquestación sofisticada de procesamiento local, algoritmos de *k*-mers optimizados, reducción de dimensionalidad mediante MinHash y filtrado adaptativo en tiempo real. Esta sinergia tecnológica es la que permite que la metagenómica shotgun trascienda las limitaciones del cultivo tradicional, ofreciendo una visión omnisciente y agnóstica de los ecosistemas biológicos en un formato portátil y clínicamente accionable (Nielsen et al., 2025).

La transición de la genómica desde un ejercicio de laboratorio estático hacia una herramienta de intervención clínica inmediata ha dependido de la capacidad de transformar señales electroquímicas ruidosas en información digital de alta fidelidad. En este contexto, la bioinformática de la secuenciación por nanoporos ha experimentado una revolución impulsada por el aprendizaje profundo, donde la arquitectura del sensor CMOS y la capacidad de cómputo

en paralelo convergen para resolver la fenomenología de la translocación de polímeros biológicos en tiempo real (Van Dijk et al., 2023).

4.5. Optimización del flujo de datos en arquitecturas de cómputo GPU

La arquitectura fundamental de los secuenciadores de nanoporos genera un flujo constante de señales analógicas que representan las caídas de corriente iónica medidas en picoamperios. Este torrente de datos, especialmente en plataformas de alto rendimiento como el PromethION, impone una carga computacional que las unidades de procesamiento central (CPU) convencionales no pueden gestionar sin introducir latencias prohibitivas para el diagnóstico agudo. Como bien analizan (Agustinho et al., 2024) y (S. Casimiro-Soriguer et al., 2025), la optimización de estos flujos de datos ha exigido la adopción masiva de unidades de procesamiento gráfico (GPU), las cuales están diseñadas para ejecutar miles de hilos de cómputo de manera simultánea, facilitando la inferencia de modelos de redes neuronales recurrentes (RNN).

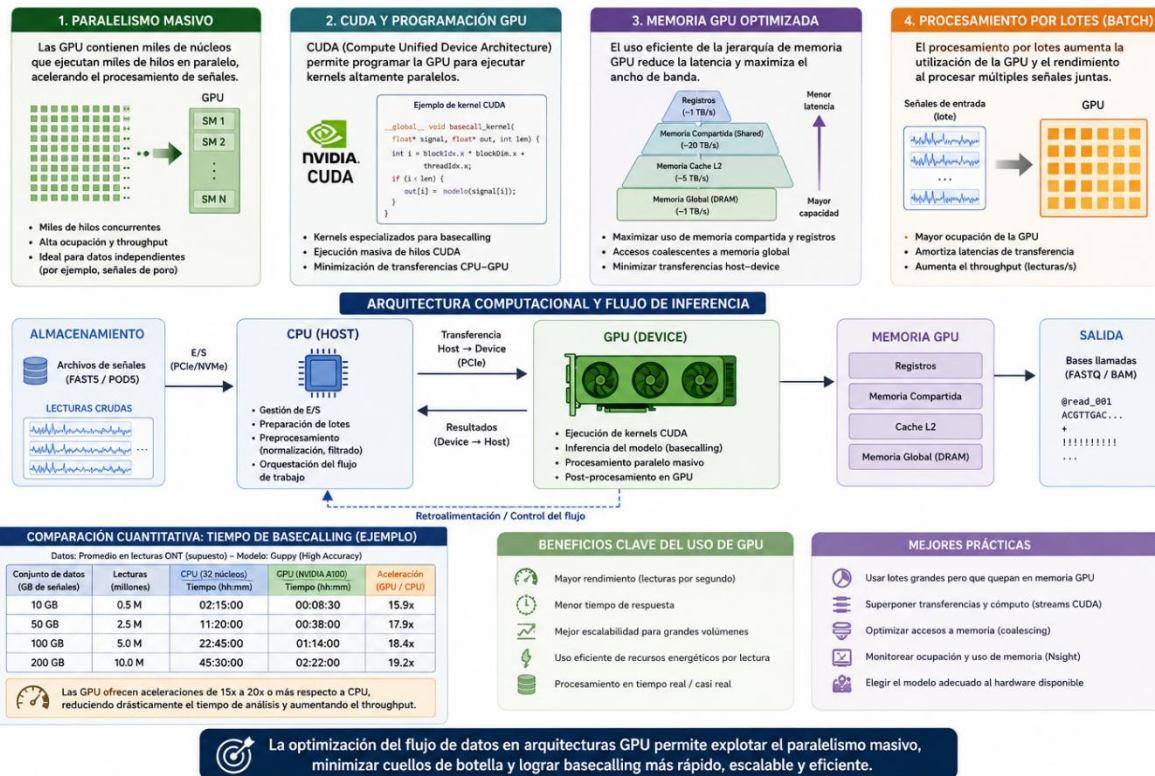
La mecánica de esta optimización reside en la capacidad de las GPU para procesar capas de memoria de corto y largo plazo bidireccionales (Bi-LSTM) integradas en algoritmos como Dorado. Según explican (Van Dijk et al., 2023) y (Agustinho et al., 2024), Dorado representa la culminación de la eficiencia computacional al desplazar a Guppy, permitiendo que la traducción de señales de "garabato" (*squiggle*) a bases nitrogenadas se realice a una velocidad que iguala o supera la tasa de translocación física del ADN (aproximadamente 400 bases por segundo).

Figura 5

Optimización del flujo de datos en arquitecturas de cómputo GPU

OPTIMIZACIÓN DEL FLUJO DE DATOS EN ARQUITECTURAS DE CÓMPUTO GPU

Procesamiento masivo y eficiente para el basecalling de señales de secuenciación



Nota: Elaboración propia a partir de (Govender et al., 2025),

La relevancia clínica de esta arquitectura es inmediata en escenarios de sepsis o meningitis bacteriana, donde la reducción del tiempo de procesamiento bioinformático permite que la identificación del patógeno comience apenas minutos después de iniciada la corrida de secuenciación, facilitando una ventana terapéutica crítica para la supervivencia del paciente (Nielsen et al., 2025). Además, la integración de procesadores gráficos potentes en dispositivos locales (*edge computing*) garantiza que los datos genómicos sensibles no abandonen el entorno hospitalario, mitigando riesgos de ciberseguridad y preservando la privacidad del paciente (Agustinho et al., 2024).

4.5.1. Integración de modelos de lenguaje para la anotación funcional de secuencias

La anotación funcional de fragmentos genómicos, especialmente en la identificación de genes de resistencia antimicrobiana (AMR) y factores de virulencia, ha trascendido los límites del alineamiento tradicional basado en homología de secuencia (como BLAST o DIAMOND). La frontera actual de la bioinformática clínica utiliza modelos de lenguaje de proteínas (PLM) entrenados en miles de millones de secuencias para capturar la gramática evolutiva de las macromoléculas. Como detallan (Manzoor et al., 2025), herramientas de vanguardia como

PLM-ARG utilizan el modelo de lenguaje ESM-1b para generar representaciones vectoriales de alta dimensionalidad, o "embeddings", que codifican tanto la estructura secundaria como las propiedades fisicoquímicas de las proteínas de resistencia.

Este enfoque de "anotación profunda" es particularmente disruptivo porque permite la detección de variantes de resistencia que presentan una identidad de secuencia baja frente a las referencias conocidas. Tal como postulan (Manzoor et al., 2025) y (Bakir et al., 2025), los modelos PLM-ARG pueden identificar con precisión mecanismos de resistencia enzimática incluso cuando la similitud de aminoácidos es marginal, superando la "ventana de ceguera" de los métodos basados en homología. La biofísica de esta detección se fundamenta en que las redes neuronales pueden reconocer patrones estructurales conservados necesarios para la catálisis antibiótica, independientemente de la divergencia de la secuencia primaria. Esta capacidad de descubrimiento es vital para la vigilancia de patógenos emergentes y el mapeo del resistoma en muestras ambientales complejas, donde la plasticidad genómica bacteriana genera constantemente nuevas variantes alélicas que evaden las bases de datos convencionales como CARD o ResFinder (Manzoor et al., 2025).

4.5.2. Métricas de calidad de lectura (Q-score) y su impacto en la confianza diagnóstica

La validez analítica de la secuenciación metagenómica depende críticamente de la exactitud con la que se asigna cada base, medida habitualmente mediante la puntuación de calidad Phred o Q-score. Un Q-score de 20 (Q20) representa una precisión del 99%, mientras que Q30 eleva esta fidelidad al 99.9%. Históricamente, la secuenciación de lectura larga luchaba por alcanzar estos niveles debido al ruido estocástico del nanoporo, pero innovaciones recientes en la química de poros y algoritmos de procesamiento han cerrado esta brecha. Como bien señalan (Van Dijk et al., 2023) y (Agustinho et al., 2024), la introducción de la química Q20+ y los poros de la serie R10 ha permitido que la plataforma Oxford Nanopore alcance niveles de exactitud de base única comparables a las tecnologías de lectura corta.

El impacto del Q-score en la confianza diagnóstica es profundo, especialmente en la detección de variantes de un solo nucleótido (SNV) que confieren resistencia a antimicrobianos críticos. (Van Dijk et al., 2023) indican que una fidelidad superior es necesaria para distinguir entre errores de secuenciación y mutaciones biológicas reales en genes como *gyrA* o *parC*, determinantes de la resistencia a fluoroquinolonas. Además, puntuaciones de calidad elevadas facilitan el ensamblaje *de novo* de genomas completos a partir de metagenomas (MAGs), permitiendo la reconstrucción de secuencias continuas y sin brechas (*gaps*) que son esenciales para el análisis filogenético de brotes intrahospitalarios (Van Dijk et al., 2023). La robustez de

estas métricas es un requisito indispensable para la validación clínica y la obtención de aprobaciones regulatorias, garantizando que las decisiones médicas se basen en datos de alta certidumbre técnica (Goktas & Grzybowski, 2025).

4.5.3. Estandarización de formatos FAST5 y POD5 en el ecosistema bioinformático

La gestión del almacenamiento y el acceso a los datos de señal cruda constituye un desafío biofísico y logístico en la metagenómica de alto rendimiento. El formato tradicional FAST5, basado en la jerarquía HDF5, permitía el almacenamiento de la señal iónica junto con los metadatos de la corrida, pero presentaba limitaciones significativas en términos de velocidad de escritura y eficiencia de acceso aleatorio. Para resolver estos inconvenientes, se ha estandarizado el uso del formato POD5. Según explican (Van Dijk et al., 2023) y las especificaciones técnicas de Oxford Nanopore Technologies (2023), el formato POD5 optimiza la organización de los datos de señal para su procesamiento directo por las GPU, reduciendo drásticamente el tamaño de los archivos y mejorando la tasa de transferencia de datos (*throughput*).

La relevancia de esta estandarización radica en la capacidad de realizar un reanálisis bioinformático a medida que evolucionan los modelos de *basecalling*. Dado que la señal cruda almacenada en POD5 preserva la fenomenología eléctrica original del nanoporo, los investigadores pueden volver a procesar las muestras con algoritmos de redes neuronales más avanzados sin necesidad de repetir la secuenciación física (Van Dijk et al., 2023). Esta "secuenciación retrospectiva digital" permite mejorar la resolución taxonómica y la detección de modificaciones epigenéticas, como la 5-metilcitosina (5mC), años después de que se obtuvo la muestra biológica original, convirtiendo al formato POD5 en un reservorio inestimable de información genómica y EPI transcriptómica para la medicina personalizada (Van Dijk et al., 2023).

4.6. Controversias actuales, análisis crítico de la evidencia y perspectivas futuras

A pesar de la sofisticación algorítmica, la integración de la inteligencia artificial (IA) en el diagnóstico genómico enfrenta controversias éticas y técnicas significativas. La naturaleza de "caja negra" de muchas redes neuronales profundas utilizadas en el *basecalling* y la anotación funcional genera escepticismo en la comunidad médica. Como argumentan (Goktas & Grzybowski, 2025), es imperativo transitar hacia una IA explicable (XAI) que proporcione métricas de confianza transparentes por cada base o función asignada, permitiendo

que el clínico valide el razonamiento automatizado antes de tomar decisiones terapéuticas críticas.

El análisis crítico de la evidencia revela que, aunque la metagenómica shotgun de lectura larga ofrece una rapidez sin precedentes, su impacto en desenlaces clínicos duros como la reducción de la mortalidad por sepsis todavía debe ser validado en ensayos clínicos aleatorizados a gran escala (Govender et al., 2025). Además, el fenómeno del "kit-oma" y la contaminación ambiental siguen siendo variables de confusión que exigen la estandarización rigurosa de controles negativos y umbrales bioinformáticos de significancia clínica (Nielsen et al., 2025).

Las perspectivas futuras se centran en la convergencia de la metagenómica con otras ómicas, como la proteómica de nanoporos, para una caracterización multimodal de la infección. (Van Dijk et al., 2023) y (Haghighat et al., 2024) anticipan que la ingeniería de biosensores integrados sobre chips CMOS permitirá el desarrollo de dispositivos portátiles "wearables" o miniaturizados que realicen diagnósticos genómicos en el punto de atención (*point-of-care*) con una autonomía absoluta. Asimismo, la implementación de marcos regulatorios como el EU AI Act proporcionará la gobernanza necesaria para asegurar que la innovación biotecnológica se traduzca en una medicina de precisión ética, equitativa y científicamente irreproachable (Goktas & Grzybowski, 2025).

En conclusión, la bioinformática clínica de la secuenciación por nanoporos integra una orquestación sofisticada de cómputo GPU, modelos de lenguaje avanzados y métricas de calidad rigurosas. Al estandarizar formatos de datos eficientes y abordar las controversias sobre la transparencia de la IA, esta disciplina se consolida como el motor que impulsa la metagenómica shotgun hacia el centro del diagnóstico molecular contemporáneo, permitiendo una visión omnisciente y accionable de la complejidad biológica (Nielsen et al., 2025).

Capítulo V

Resistómica Estructural: Predicción de Fenotipo de Resistencia desde el Genotipo

La crisis global de la resistencia antimicrobiana (AMR) ha exigido un cambio de paradigma en el diagnóstico microbiológico, transitando de la observación del crecimiento bacteriano *in vitro* hacia el análisis profundo de la arquitectura genómica de los patógenos. Como bien exponen (Alcock et al., 2023), la resistómica estructural se fundamenta en la capacidad de decodificar el conjunto total de genes de resistencia presentes en un metagenoma, permitiendo una inferencia fenotípica que anticipa los resultados de las pruebas de susceptibilidad tradicionales por un margen de tiempo críticamente vital para la supervivencia del paciente. En este contexto, la bioinformática clínica no actúa como un mero catálogo de secuencias, sino como un sistema de inteligencia biológica que integra ontologías estructuradas y modelos predictivos para guiar la terapéutica antibiótica de precisión.

5.1. Mapeo de determinantes de resistencia mediante alineamiento con bases de datos curadas (CARD/ResFinder)

El mapeo de determinantes genéticos de resistencia representa la primera línea de defensa bioinformática frente a infecciones multirresistentes. Este proceso depende de la robustez y actualización de repositorios genómicos de referencia, entre los cuales el Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) y ResFinder se han consolidado como los estándares de oro. Tal como analizan (Alcock et al., 2023), la arquitectura de CARD se apoya en la Antibiotic Resistance Ontology (ARO), un marco conceptual que organiza el conocimiento sobre AMR en redes de relaciones lógicas que vinculan genes específicos con sus mecanismos moleculares, las moléculas antibióticas que inactivan y los fenotipos resultantes.

La mecánica analítica del mapeo implica el uso de algoritmos de alineamiento local de alta sensibilidad. Según detallan (Florensa et al., 2022), herramientas como ResFinder 4.0 permiten la identificación de genes de resistencia adquiridos mediante el alineamiento de lecturas crudas de nanoporos contra bases de datos que incluyen miles de alelos validados experimentalmente. Para garantizar la veracidad diagnóstica, se deben aplicar umbrales de rigor biofísico, (Govender et al., 2025) proponen el uso de parámetros estrictos, como una identidad de secuencia superior al 60% y una cobertura del fragmento de referencia mayor al 99%. Estas restricciones aseguran que el llamado genotípico no se base en fragmentos espurios,

sino en secuencias que representan proteínas funcionales capaces de conferir resistencia clínica.

La relevancia clínica de este mapeo es inmediata en el manejo de la sepsis bacteriana. Como sugieren (Pinzauti et al., 2025) y (Meslier et al., 2022), la detección de genes de carbapenemasas, como *blaKPC*, *blaNDM* o *blaOXA-48*, directamente de muestras de sangre o hemocultivos positivos, permite una desescalada antibiótica hasta 20 horas antes de que las pruebas fenotípicas (AST) proporcionen un resultado (Govender et al., 2025). Además, la integración de bases de datos como AMRFinderPlus, mantenida por el NCBI, expande esta capacidad al incluir determinantes de virulencia y genes de respuesta al estrés, proporcionando un perfil biológico integral del patógeno invasor (Florensa et al., 2022). No obstante, es imperativo reconocer que el éxito del mapeo está supeditado a la calidad de la biblioteca; en muestras con baja biomasa microbiana, el uso de filtros "nudged" o permisivos puede incrementar la sensibilidad de detección, aunque a riesgo de capturar contaminantes ambientales o del "kit-oma" (Nielsen et al., 2025).

5.2. Identificación de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) asociados a resistencia a quinolonas

A diferencia de la resistencia mediada por la adquisición horizontal de genes, la resistencia a fluoroquinolonas una de las familias de antibióticos más utilizadas en la práctica clínica suele originarse por mutaciones puntuales o polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en los genes que codifican sus dianas terapéuticas. La biofísica de este mecanismo reside en la alteración de la afinidad de unión entre el fármaco y las enzimas topoisomerasas tipo II: la ADN girasa (subunidades *gyrA* y *gyrB*) y la topoisomerasa IV (subunidades *parC* y *parE*).

Tal como analizan (Tian et al., 2026) en su estudio sobre *Enterococcus faecium*, las sustituciones de aminoácidos en la región determinante de la resistencia a quinolonas (QRDR) son los principales impulsores del fracaso terapéutico con ciprofloxacino. Por ejemplo, mutaciones específicas en los codones 84 y 88 de *gyrA*, a menudo combinadas con alteraciones en el codón 82 de *parC*, elevan drásticamente la concentración mínima inhibitoria (MIC) por encima de los umbrales de susceptibilidad clínica (Tian et al., 2026). La identificación de estos SNPs mediante secuenciación de nanoporos exige una fidelidad de base excepcional, ya que un solo error de *basecalling* en estas regiones críticas derivaría en un falso diagnóstico genotípico.

Para abordar este desafío, la bioinformática clínica emplea modelos de variantes de proteínas. Según explican (Alcock et al., 2023) y (Florensa et al., 2022), herramientas como PointFinder (integrada en ResFinder) y el "protein variant model" de CARD están diseñadas para distinguir entre mutaciones silenciosas y polimorfismos que tienen un impacto funcional en la estructura proteica. En patógenos de crecimiento lento como *Mycobacterium tuberculosis*, esta capacidad es disruptiva; la identificación de SNPs asociados a resistencia a fármacos de primera y segunda línea permite iniciar regímenes antituberculosos efectivos semanas antes de lo que permitiría el cultivo tradicional (Coll et al., 2024). La evidencia acumulada (Rannon et al., 2025) demuestra que modelos de aprendizaje automático entrenados con estos datos genómicos pueden predecir la MIC exacta de ciprofloxacino en *Escherichia coli*, transformando la mNGS de una prueba cualitativa en una herramienta de metrología diagnóstica cuantitativa.

5.3. Detección de elementos genéticos móviles y plásmidos de resistencia en lecturas largas

La capacidad de los nanoporos para generar lecturas ultra-largas (ULR) ha resuelto uno de los mayores enigmas de la microbiología, la localización física de los genes de resistencia. En la secuenciación de lectura corta, los elementos genéticos móviles (MGEs), como las secuencias de inserción (IS), los transposones y los integrones, suelen fragmentarse durante el ensamblaje, impidiendo determinar si un gen de resistencia se encuentra integrado en el cromosoma bacteriano o reside en un plásmido extra cromosómico. Como argumentan (Van Dijk et al., 2023) y (Agustinho et al., 2024), las lecturas de lectura larga actúan como puentes estructurales que atraviesan estas regiones repetitivas, permitiendo la reconstrucción completa y circular de plásmidos multirresistentes.

La detección de plásmidos es vital para entender la dinámica de transmisión horizontal en entornos hospitalarios. (Maugeri et al., 2025) ilustran cómo el uso de la secuenciación de nanoporos facilitó la identificación de cepas de *Klebsiella pneumoniae* portadoras de plásmidos IncFIB(K) e IncFIIpKP91, los cuales actúan como vehículos para la diseminación de genes *blaKPC-3* y determinantes de virulencia como la aerobactina. Esta caracterización permite diferenciar entre brotes clonales (transmisión de una misma bacteria) y brotes de plásmidos (transmisión de un fragmento genético entre diferentes especies), una distinción fundamental para la implementación de medidas de control de infecciones efectivas (Struelens et al., 2024).

Desde una perspectiva biofísica, la estabilidad de los plásmidos durante la translocación es notable. (L. Jiang et al., 2025) sugieren que las estructuras secundarias de los ADN plasmáticos circulares podrían ofrecer una protección parcial contra la degradación enzimática

por nucleasas, lo que facilita su recuperación en muestras clínicas. El uso de herramientas bioinformáticas especializadas, como PlasmidFinder, en combinación con el ensamblaje *de novo* mediante algoritmos como MetaFlye o Hifiasm-meta, permite la generación de genomas bacterianos completos y cerrados sin la necesidad de recurrir a la secuenciación híbrida con Illumina (Rannon et al., 2025). Esta autonomía tecnológica posiciona a la secuenciación de nanoporos como la plataforma definitiva para la vigilancia genómica global, capaz de mapear el flujo de genes de resistencia entre el microbioma humano, animal y ambiental, en consonancia con el enfoque "One Health" (Manzoor et al., 2025).

En conclusión, la resistómica estructural impulsada por la secuenciación de lectura larga representa la culminación de la medicina genómica aplicada a las enfermedades infecciosas. Al integrar el mapeo de determinantes en bases de datos curadas, la detección precisa de SNPs en dianas farmacológicas y la resolución estructural de plásmidos y elementos móviles, esta disciplina proporciona una visión omnisciente del resistoma que trasciende las limitaciones temporales y analíticas del laboratorio de microbiología convencional. Esta orquestación bioinformática es la que garantiza que, en el futuro cercano, el genotipo microbiano sea el principal orientador de la prescripción antimicrobiana racional y efectiva (Nielsen et al., 2025).

La crisis global de la resistencia antimicrobiana (AMR) ha exigido una transición desde la microbiología observacional descriptiva hacia un modelo de metrología molecular predictiva. En este contexto, la resistómica estructural surge como una disciplina que busca descifrar la arquitectura genómica total de una comunidad microbiana para inferir, con precisión matemática, la respuesta clínica ante agentes farmacológicos. Como bien exponen (Alcock et al., 2023), este paradigma se apoya en la Antibiotic Resistance Ontology (ARO), la cual proporciona un marco conceptual jerarquizado que vincula secuencias nucleotídicas con mecanismos moleculares específicos y fenotipos de susceptibilidad validados. La capacidad de transitar del genotipo al fenotipo sin la latencia del cultivo microbiológico representa uno de los hitos más significativos en la medicina de precisión contemporánea (Nielsen et al., 2025).

5.4. Predicción del CMI (Concentración Inhibitoria Mínima) mediante modelos de Machine Learning

La cuantificación del nivel de resistencia, expresada a través de la Concentración Inhibitoria Mínima (CMI), es fundamental para optimizar la dosificación antimicrobiana y minimizar la toxicidad sistémica. Históricamente, el diagnóstico genómico se limitaba a una clasificación binaria (resistente o sensible), ignorando la gradación biológica del fenómeno. No

obstante, la integración de modelos de aprendizaje automático (Machine Learning, ML) y redes neuronales profundas ha permitido el desarrollo de paneles de CMI *in silico*. Tal como analizan (Rapszky et al., 2025) y (Feijoó et al., s. f.), el entrenamiento de algoritmos con miles de genomas vinculados a datos de microdilución en caldo ha facilitado la identificación de *k*-mers y variantes de nucleótido único (SNPs) que correlacionan con incrementos específicos en la CMI.

La mecánica de esta predicción trasciende el mero alineamiento de secuencias. Según detallan (Manzoor et al., 2025), se emplean arquitecturas de redes neuronales recurrentes (RNN) y modelos de bosques aleatorios (Random Forest) que consideran no solo la presencia de un determinante de resistencia, sino también la sinergia de variantes estructurales y mutaciones en regiones promotoras que alteran la expresión génica. Por ejemplo, en el caso de *Escherichia coli* y su susceptibilidad al ciprofloxacino, los modelos de ML pueden predecir la CMI exacta analizando las sustituciones de aminoácidos en las subunidades de la ADN girasa (*gyrA*) y la topoisomerasa IV (*parC*), alcanzando una precisión que rivaliza con los métodos fenotípicos estandarizados (Manzoor et al., 2025). La relevancia clínica de esta tecnología es inmediata en el manejo de la sepsis, la capacidad de anticipar el perfil de CMI permite ajustar el régimen antibiótico hacia una terapia dirigida de espectro estrecho en una ventana temporal críticamente temprana, lo que impacta directamente en la reducción de la mortalidad hospitalaria (Govender et al., 2025).

5.5. Análisis del resistoma "oculto" y genes de resistencia de baja expresión

Uno de los mayores desafíos bioinformáticos en la metagenómica clínica es la detección de lo que se denomina el resistoma "oculto". Este término engloba a aquellos genes de resistencia que presentan una identidad de secuencia marginal frente a los alelos catalogados en bases de datos como CARD o ResFinder, o aquellos determinantes cuya expresión basal es tan reducida que evaden la detección mediante enfoques transcriptómicos convencionales. Como argumentan (Manzoor et al., 2025), los métodos basados exclusivamente en homología de secuencia sufren de una "ventana de ceguera" ante la plasticidad evolutiva de las bacterias, lo que puede resultar en errores muy graves (VMEs) donde un patógeno es clasificado como sensible a pesar de poseer un mecanismo de resistencia funcionalmente activo.

Para resolver este enigma, se ha implementado el uso de modelos de lenguaje de proteínas (Protein Language Models, PLM) y metagenómica funcional. Herramientas de vanguardia como PLM-ARG utilizan representaciones vectoriales de alta dimensionalidad (*embeddings*) para capturar la "gramática estructural" de las proteínas de resistencia. Según el

análisis de (Manzoor et al., 2025) y (Bakir et al., 2025), estos modelos pueden identificar enzimas modificadoras de antibióticos basándose en patrones de plegamiento conservados, incluso cuando la similitud de la secuencia primaria es inferior al 40%. Complementariamente, la base de datos ResFinderFG 2.0 integra determinantes obtenidos mediante cribado funcional en ecosistemas diversos, permitiendo el mapeo de genes de resistencia previamente desconocidos que residen en la "materia oscura" del genoma microbiano (Gschwind et al., 2023).

Asimismo, el análisis del resistoma oculto debe considerar los mecanismos de eflujo inespecífico. (Govender et al., 2025) subrayan que plataformas como RGI (CARD) suelen filtrar los resultados asociados a bombas de eflujo debido a que su impacto en la resistencia clínica es altamente dependiente del contexto de expresión y de la integridad de los sistemas reguladores. No obstante, en un modelo de resistómica estructural integral, la detección de mutaciones en genes represores (como *mexR* o *nfxB* en *Pseudomonas aeruginosa*) proporciona una señal indirecta de sobreexpresión de eflujo, permitiendo una inferencia más robusta del fenotipo de multirresistencia (Govender et al., 2025).

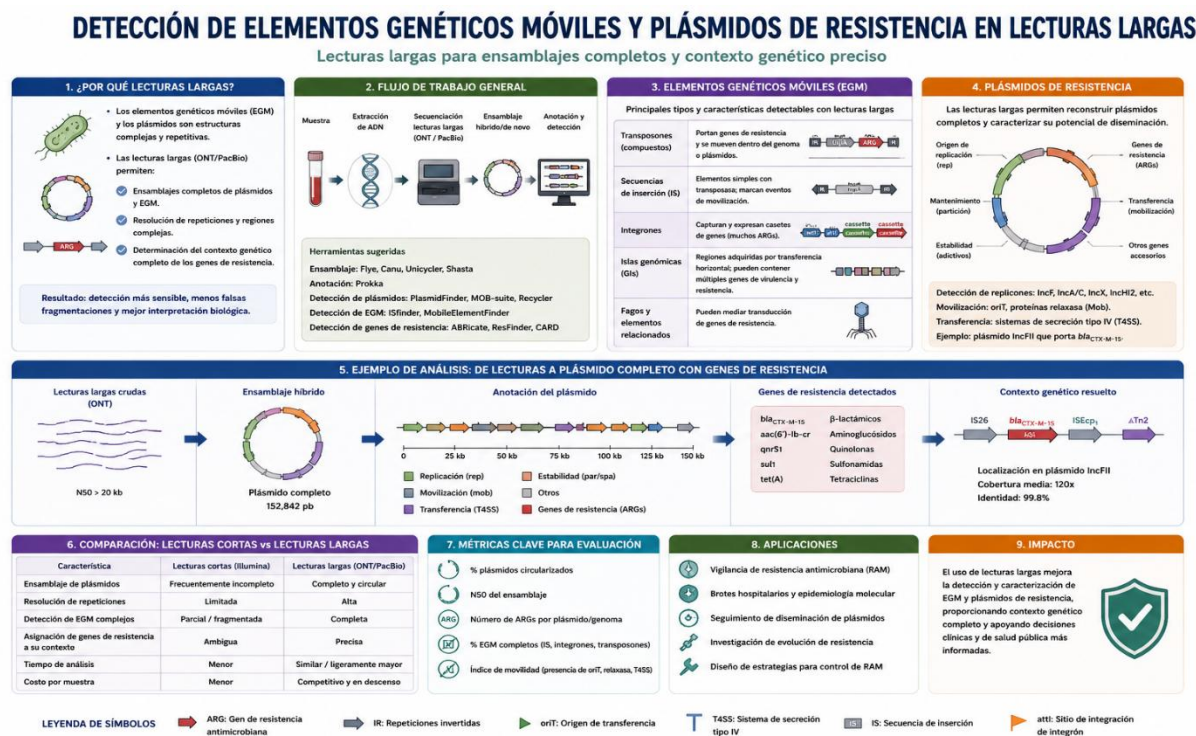
5.6. Detección de heteroresistencia en poblaciones bacterianas heterogéneas

La heteroresistencia representa un fenómeno biofísico de alta complejidad donde coexisten subpoblaciones microbianas con perfiles de susceptibilidad divergentes dentro de un mismo aislado clínico. Esta heterogeneidad suele ser el preludio del fracaso terapéutico, ya que la presión selectiva ejercida por el antibiótico elimina a la población sensible y permite la proliferación de clones con CMI elevadas. Como bien analizan (Agustinho et al., 2024) y (Van Dijk et al., 2023), la secuenciación de lectura larga (LRS) es la única herramienta capaz de resolver esta arquitectura poblacional mediante el faseado metagenómico y la reconstrucción de haplotipos.

A diferencia de la secuenciación de lectura corta, que genera un promedio de la señal genómica de la muestra, los nanoporos permiten la captura de fragmentos de ADN lo suficientemente extensos para abarcar múltiples variantes genéticas en una sola lectura. Según explican (Tian et al., 2026) y (Guo et al., 2025), algoritmos como stRainy o Strainberry facilitan la separación de secuencias pertenecientes a diferentes cepas o variantes alélicas raras. Esta capacidad es vital para detectar la presencia minoritaria de genes de resistencia como las metalo-beta-lactamasas del tipo NDM que podrían estar presentes en solo una fracción de la biomasa microbiana total (Agustinho et al., 2024).

Figura 6

Detección de heteroresistencia en poblaciones bacterianas heterogéneas



Nota: Elaboración propia a partir de (Govender et al., 2025),

La detección de variantes de baja frecuencia mediante nanoporos exige un control riguroso de la fidelidad de base. (Liu et al., 2025) destacan que el uso de modelos de aprendizaje profundo para la corrección de errores estocásticos permite "rescatar" variantes que anteriormente eran confundidas con ruido del sensor. En el contexto clínico, identificar una subpoblación heterorresistente antes de iniciar el tratamiento previene la selección involuntaria de cepas pan-resistentes, permitiendo el uso de combinaciones antibióticas sinérgicas que neutralicen todos los componentes del ecosistema infeccioso (Agustinho et al., 2024).

5.7. Interacción entre el resistoma del microbioma residente y el patógeno invasor

La patogenia de las infecciones invasivas no ocurre de manera aislada, sino que es el resultado de una dinámica de transferencia genética entre la microbiota comensal y el agente etiológico. El reservorio de genes de resistencia en el microbioma humano especialmente en el tracto gastrointestinal constituye una amenaza latente para la salud sistémica. Como ilustran (Maugeri et al., 2025) en su estudio sobre *Klebsiella pneumoniae*, la colonización intestinal precede frecuentemente a la bacteriemia, y los aislados invasores a menudo comparten el mismo resistoma plasmídico que las cepas saprófitas residentes.

La biofísica de esta interacción está mediada por la transferencia horizontal de genes (HGT) a través de elementos genéticos móviles (MGEs), predominantemente plásmidos conjugativos. (Q. Zhang et al., 2023) y (Bélanger et al., 2026) demuestran que el uso de lecturas ultra-largas permite mapear con precisión los sitios de inserción de genes de resistencia y determinar su movilidad potencial. En entornos polimicrobianos, el resistoma residente actúa como una "biblioteca de recursos genéticos" de la cual el patógeno invasor puede adquirir determinantes de virulencia y resistencia ante la exposición a fármacos (Q. Zhang et al., 2023).

El análisis crítico de estas interacciones revela que el éxito del patógeno invasor depende de su capacidad para integrarse metabólicamente y competir con la microbiota nativa. Como señalan (Ahannach et al., 2021), factores como la producción de sideróforos y la modulación de la respuesta inmune del hospedador facilitan el salto desde la colonización mucosa hacia la invasión del compartimento hemático. La metagenómica shotgun de nanoporos, al proporcionar una visión agnóstica del ecosistema total, permite monitorizar este flujo de genes de resistencia en tiempo real, facilitando una vigilancia epidemiológica bajo el enfoque "One Health" que integra la salud humana con los reservorios ambientales y animales (Manzoor et al., 2025).

En conclusión, la resistómica estructural representa la culminación de la integración entre la biofísica de poros, la computación avanzada y la infectología clínica. Al trascender las limitaciones de la identificación taxonómica simple y adentrarse en la predicción cuantitativa de CMIs, el análisis del resistoma oculto, la resolución de la heteroresistencia y el mapeo de las interacciones microbianas, esta disciplina dota al clínico de una inteligencia biológica superior para enfrentar el desafío de las infecciones multirresistentes en el siglo XXI (Nielsen et al., 2025).

La arquitectura diagnóstica de la infectología contemporánea ha trascendido la mera identificación taxonómica para adentrarse en la decodificación funcional de la capacidad adaptativa bacteriana. Como bien postulan (Alcock et al., 2023), la resistómica estructural representa la integración de la genómica comparativa con el modelado probabilístico, permitiendo una transición desde el aislamiento celular reactivo hacia una metrología molecular predictiva. Este paradigma se sustenta en la capacidad de las tecnologías de secuenciación de lectura larga para resolver no solo la presencia de determinantes genéticos, sino también el contexto genómico y las variaciones estructurales que modulan la expresión fenotípica de la resistencia antimicrobiana (AMR) en ecosistemas microbianos complejos (Agustinho et al., 2024).

5.6.1. Identificación de bombas de eflujo y mutaciones en porinas mediante NGS

La resistencia a los antibióticos en los patógenos Gram negativos no depende exclusivamente de la adquisición de enzimas inactivadoras; la biofísica de la permeabilidad de la membrana y los mecanismos de expulsión activa constituyen la primera línea de defensa bacteriana. La identificación de bombas de eflujo, como el sistema RND (Resistance-Nodulation-Division) tipo AcrAB-TolC, presenta un desafío analítico superior. Según el análisis crítico de (Govender et al., 2025), estas estructuras suelen estar codificadas cromosómicamente y su impacto clínico es altamente dependiente de niveles de expresión regulados por redes complejas de promotores y represores, como *marR* o *soxR*. La secuenciación metagenómica (mNGS) permite detectar polimorfismos en estas regiones reguladoras que derivan en un estado de hiper-expresión, traducándose en una expulsión multidrogas de amplio espectro (Govender et al., 2025). No obstante, herramientas como RGI (CARD) suelen ser configuradas con criterios estrictos para filtrar estos mecanismos debido a su naturaleza inespecífica y la dificultad de correlacionar la presencia del gen con una resistencia de nivel clínico sin datos transcriptómicas concomitantes (Govender et al., 2025).

Paralelamente, la dinámica de entrada de los fármacos es mediada por porinas de la membrana externa, como OmpK35 y OmpK36 en *Klebsiella pneumoniae*. La biofísica de la resistencia en este nivel implica una restricción estérica o electrostática del canal proteico. Como ilustran (Maugeri et al., 2025), el uso de NGS de alta resolución facilita la detección de mutaciones de cambio de sentido (*missense*) o inserciones/deleciones (*indels*) en los bucles de constricción de estas porinas. Estas alteraciones estructurales reducen drásticamente la tasa de difusión de los carbapenémicos hacia el espacio periplasmático, potenciando el efecto de las betalactamasas de baja actividad. La relevancia clínica de estas mutaciones es inmediata, la pérdida funcional de una sola porina puede elevar la concentración inhibitoria mínima (CMI) de un fármaco por encima del umbral de susceptibilidad, resultando en fracasos terapéuticos incluso cuando las pruebas moleculares rápidas para genes de carbapenemasas resultan negativas (Meslier et al., 2022). La capacidad de la secuenciación de lectura larga para atravesar estas regiones genómicas de baja complejidad y detectar variantes estructurales posiciona a la resistómica estructural como una herramienta inestimable para el manejo de infecciones causadas por clones hipervirulentos y multirresistentes como ST101 o ST307 (Maugeri et al., 2025).

5.6.2. Validación de la concordancia genotipo-fenotipo en Gram negativos multirresistentes

La validez de la mNGS como herramienta diagnóstica reposa sobre la robustez de la concordancia entre el perfil genotípico detectado y el comportamiento fenotípico observado en el laboratorio de microbiología. Como bien exponen (Pinzauti et al., 2025) y (Govender et al., 2025), los estudios multicéntricos han demostrado niveles de concordancia diagnóstica superiores al 90% para los principales grupos de antibióticos en bacilos Gram negativos. Esta validación se apoya en flujos de trabajo como el protocolo PISTE, que integra la purificación automatizada de ácidos nucleicos con el *basecalling* en tiempo real, permitiendo una identificación genotípica de carbapenemasas como *blaKPC*, *blaNDM* o *blaOXA-48* hasta 20 horas antes de que las pruebas de susceptibilidad (AST) convencionales proporcionen un resultado (Govender et al., 2025).

Sin embargo, el análisis de la concordancia debe ser interpretado bajo un prisma doctoral, reconociendo las causas de discordancia. Los denominados "errores muy graves" (VMEs) ocurren cuando un patógeno es clasificado genotípicamente como sensible pero se comporta como resistente fenotípicamente, a menudo debido a la presencia de mecanismos de resistencia "ocultos" o mutaciones en dianas terapéuticas que evaden las bases de datos de referencia (Govender et al., 2025). Por el contrario, la detección de un gen de resistencia sin un correlato fenotípico puede deberse a la presencia de genes silentes o defectuosos. Según detallan (Nielsen et al., 2025) y (Alcock et al., 2023), para mitigar estos riesgos, la bioinformática clínica utiliza umbrales de rigor biometrológico, como una identidad de secuencia >60% y una cobertura del fragmento de referencia >99%, asegurando que las predicciones se basen en genes funcionalmente íntegros. La evidencia acumulada por (Florensa et al., 2022) sugiere que la integración de redes neuronales profundas entrenadas con grandes conjuntos de datos genotipo-fenotipo permite no solo clasificar la resistencia, sino incluso predecir con precisión la CMI *in silico*, transformando la mNGS en una herramienta de precisión para la optimización de la dosificación antimicrobiana (Nielsen et al., 2025).

5.7. Sistemas de alerta temprana ante la detección de carbapenemasas emergentes

La vigilancia epidemiológica global de la resistencia antimicrobiana exige sistemas de respuesta ágiles que actúen en los límites de la emergencia de nuevos linajes multirresistentes. Los sistemas de alerta temprana basados en metagenómica de nanoporos aprovechan la agosticidad taxonómica para detectar patógenos y determinantes de resistencia sin objetivos preestablecidos. Tal como analizan (Struelens et al., 2024), la implementación de circuitos de vigilancia genómica en tiempo real permite la identificación instantánea de eventos de

transferencia horizontal de genes (HGT) mediados por plásmidos. Al resolver las secuencias ultra-largas de los fragmentos introducidos, los clínicos pueden discernir si un gen de carbapenemasa emergente, como una nueva variante de NDM, está integrado en el cromosoma o reside en un plásmido altamente transmisible, lo que dicta la magnitud de las medidas de control de infecciones necesarias (Struelens et al., 2024).

Tabla 6

Componentes de un sistema de alerta temprana para carbapenemasas

Componente	Función	Resultado esperado	Aplicación clínica y epidemiológica
Obtención de la muestra	Recolección y preparación del material clínico para análisis molecular.	Muestra adecuada para extracción y secuenciación.	Constituye el punto inicial para una detección oportuna.
Extracción de ADN	Recuperación del material genético bacteriano presente en la muestra.	ADN con calidad y cantidad suficientes.	Una extracción adecuada favorece la sensibilidad del análisis.
Secuenciación Nanopore	Generación de lecturas de ADN mediante detección de cambios en la corriente iónica.	Lecturas moleculares en tiempo real.	Permite iniciar el análisis sin esperar necesariamente a completar la corrida.
Basecalling	Conversión de señales eléctricas en secuencias de nucleótidos.	Lecturas digitales interpretables.	Permite comenzar el procesamiento bioinformático.
Control de calidad	Evaluación de calidad, longitud y características de las lecturas.	Datos aptos para análisis.	Reduce la posibilidad de generar alertas a partir de información deficiente.
Identificación taxonómica	Determinación del microorganismo presente mediante comparación de secuencias.	Identificación bacteriana.	Permite relacionar el mecanismo de resistencia con el microorganismo portador.
Detección de genes de resistencia	Búsqueda de secuencias asociadas con carbapenemasas y otros determinantes de resistencia.	Identificación de genes potencialmente relevantes.	Permite reconocer mecanismos de resistencia antes de que exista una expansión epidemiológica evidente.
Caracterización genética	Análisis del contexto genético y, cuando la calidad de los datos lo permite, de elementos asociados al gen de resistencia.	Información molecular ampliada.	Puede ayudar a investigar la posible relación entre aislamientos y eventos de transmisión.
Criterios de alerta	Aplicación de reglas basadas en identidad, cobertura, calidad y relevancia clínica/epidemiológica.	Clasificación de hallazgos como señal de alerta o resultado que requiere confirmación.	Evita que cualquier detección molecular sea interpretada automáticamente como un evento epidemiológico.

Alerta automatizada	Comunicación del hallazgo al personal responsable mediante un sistema informático.	Notificación rápida.	Reduce el intervalo entre detección y respuesta.
Confirmación	Verificación del hallazgo mediante métodos microbiológicos o moleculares apropiados.	Resultado confirmado.	Aumenta la seguridad antes de adoptar decisiones clínicas o epidemiológicas.
Vigilancia epidemiológica	Integración de los resultados con información de otros pacientes, servicios o instituciones.	Identificación de patrones y posibles brotes.	Permite monitorear la aparición y propagación de resistencia.
Respuesta institucional	Activación de procedimientos de control de infecciones según los protocolos establecidos.	Intervención temprana.	Puede contribuir a limitar la transmisión de microorganismos resistentes.

Nota: Elaboración propia a partir de (S. Casimiro-Soriguer et al., 2025)

La creación de sistemas de alerta temprana para las carbapenemasas que están surgiendo nos muestra cómo la secuenciación Nanopore puede ser una herramienta útil. No solo se dedica a reconocer microorganismos, sino que también puede ayudar a convertir datos genéticos en una respuesta de vigilancia efectiva. Lo fascinante de este método se encuentra en la unión de diferentes niveles de evaluación: inicialmente, se capta la señal molecular; después, se produce la secuencia mediante el basecalling; se reconoce el microorganismo; se investigan los genes vinculados a la resistencia y, por último, se utilizan criterios para determinar si el hallazgo requiere una alerta o una validación adicional. Este procedimiento es esencial, ya que la aparición de un gen de resistencia debe ser analizada considerando su identidad, cobertura, calidad de la lectura, el microorganismo anfitrión y el contexto clínico.

Es vital no confundir una señal bioinformática con una verificación automática del fenotipo de resistencia. Cuando todos estos factores se combinan correctamente, la información puede ser transmitida más rápidamente al laboratorio clínico y a los equipos de vigilancia epidemiológica. Esto apoya la investigación de casos sospechosos, la detección de agrupamientos y la respuesta ante posibles brotes en entornos hospitalarios.

Así, la alerta temprana se establece como el punto de conexión entre la secuenciación, la inteligencia bioinformática, la microbiología clínica y el control epidemiológico, con la capacidad de transformar la identificación de mecanismos de resistencia de una actividad que era mayormente retrospectiva a una vigilancia más activa y predictiva.

La arquitectura de estos sistemas de alerta se beneficia de flujos de trabajo de *edge computing*. Según describen (S. Casimiro-Soriguer et al., 2025) y (Agustinho et al., 2024), el

procesamiento local de datos genómicos en dispositivos integrados permite que la detección de una "amenaza genómica" ocurra en milisegundos tras su translocación por el poro. Este mecanismo de detección temprana es vital para la contención de brotes intrahospitalarios de organismos productores de carbapenemasas (CPE), donde la latencia del cultivo tradicional permitiría la propagación silente del patógeno. Además, la integración de marcos de inteligencia artificial "explicable" asegura que las alertas generadas por el sistema sean validadas mediante métricas de confianza transparentes, facilitando una respuesta de salud pública coordinada y basada en evidencia molecular de alta fidelidad (Struelens et al., 2024).

5.7.1. Controversias actuales, análisis crítico de la evidencia y perspectivas futuras

A pesar de la sofisticación técnica, la resistómica estructural enfrenta controversias que condicionan su aplicabilidad universal. El debate más intenso se centra en la interpretación de la "señal genómica basal" o DNAemia. Como analizan (Nielsen et al., 2025) y (Tian et al., 2026), la ubicuidad de fragmentos de ADN microbiano en la sangre de individuos sanos impone el reto de definir umbrales de significancia clínica que distingan la translocación fisiológica de la patogenia invasiva activa. El análisis crítico de la evidencia recopilada en cuadros de sepsis revela que la utilización de estándares internos ("spike-ins") y la cuantificación absoluta de la carga microbiana (GPM) son fundamentales para evitar falsos diagnósticos derivados de contaminantes ambientales o del "kit-oma" (Nielsen et al., 2025).

Otra controversia técnica radica en la dependencia de las bases de datos taxonómicas y de resistencia, las cuales presentan sesgos de representación hacia microorganismos de relevancia histórica. (Agustinho et al., 2024) subrayan que esta asimetría informativa puede generar una "ventana de ceguera" para patógenos emergentes o parásitos microeucariotas raros cuyas secuencias no están adecuadamente catalogadas. El futuro de la disciplina apunta hacia el uso de modelos de lenguaje de proteínas (PLM) que reconozcan funciones enzimáticas basándose en patrones estructurales conservados, independientemente de la divergencia de la secuencia primaria, superando así los límites del alineamiento por homología (Manzoor et al., 2025).

Las perspectivas futuras se vislumbran en la convergencia de la metagenómica con la proteómica de nanoporos y la medicina personalizada. (Van Dijk et al., 2023) y (Haghighat et al., 2024) anticipan el desarrollo de biosensores portátiles integrados sobre chips CMOS que realicen una monitorización multimodal de la infección en el punto de atención (*point-of-care*). Esta autonomía diagnóstica, combinada con la capacidad de interrogar modificaciones epigenéticas y el EPI transcriptoma bacteriano directamente desde la muestra nativa, permitirá

una comprensión holística de la infección como un evento biológico dinámico (Van Dijk et al., 2023). En última instancia, la transición hacia una IA confiable y regulada garantizará que la innovación biotecnológica se traduzca en una reducción sistémica de la mortalidad por enfermedades infecciosas multirresistentes en el siglo XXI (Goktas & Grzybowski, 2025).

En conclusión, la resistómica estructural impulsada por la secuenciación de nanoporos representa la culminación de la integración entre la biofísica, la computación avanzada y la clínica médica. Al descifrar la complejidad de las bombas de eflujo, validar la concordancia genotipo-fenotipo y establecer sistemas de alerta temprana, esta disciplina proporciona el conocimiento genómico necesario para enfrentar la crisis de la resistencia antimicrobiana con una precisión que redefine los estándares de la medicina moderna (Nielsen et al., 2025).

Capítulo VI

Transcriptómica Dual y Análisis de la Respuesta Inmune del Huésped

La medicina genómica de precisión ha evolucionado desde la mera caracterización taxonómica del agente agresor hacia una comprensión integrada de la interacción biológica entre el patógeno y el hospedador humano. Este cambio de paradigma se sustenta en la capacidad de las tecnologías de secuenciación de molécula única para interrogar, de manera simultánea y agnóstica, el flujo de información transcripcional que emana de ambos compartimentos durante un evento infeccioso sistémico. Como bien señalan (Van Dijk et al., 2023), la transcriptómica de nanoporos permite capturar una "fotografía molecular" dinámica que trasciende las limitaciones de los biomarcadores proteicos convencionales, facilitando una resolución diagnóstica y pronóstica en escenarios de alta complejidad clínica, como la sepsis y el distrés respiratorio agudo.

6.1. Análisis simultáneo del transcriptoma del patógeno y del paciente

El fundamento de la transcriptómica dual reside en la captura paralela de los mensajeros biológicos que orquestan tanto la virulencia microbiana como la respuesta inmunológica del paciente. Históricamente, el análisis del transcriptoma microbiano en muestras clínicas se veía eclipsado por la abrumadora abundancia de ARN mensajero (mARN) y ARN ribosomal (rARN) del hospedador. No obstante, innovaciones recientes en la biofísica de la secuenciación directa de ARN nativo han permitido resolver este desequilibrio. Tal como analizan (Agustinho et al., 2024) y (Van Dijk et al., 2023), la tecnología de nanoporos es la única plataforma capaz de secuenciar hebras de ARN en su estado original, preservando las modificaciones epitranscriptómicas que regulan la estabilidad de los transcritos.

La mecánica analítica de esta transcriptómica dual exige una orquestación preanalítica sofisticada. Según detallan (Nielsen et al., 2025), el uso de sistemas de estabilización inmediata del ARN, como los tubos PAXgene, es imperativo para fijar el perfil transcripcional en el momento de la extracción, evitando la degradación mediada por exorribonucleasas ubicuas en la sangre. Una vez estabilizada la muestra, se aplican algoritmos de depleción bioinformática y enzimática. (Agustinho et al., 2024) explican que, mediante el uso de sondas magnéticas dirigidas contra el rARN humano, es posible enriquecer las señales de ARN microbiano que, aunque representan menos del 1% del material total, contienen la información crítica sobre la activación de genes de resistencia y factores de colonización invasiva.

La relevancia clínica de esta aproximación es profunda. Como sugieren (Pinzauti et al., 2025) y (Struelens et al., 2024), la identificación simultánea del patógeno y su estado metabólico permite al clínico discernir si un microorganismo detectado genómicamente está ejerciendo una patogenia activa o si se encuentra en un estado de latencia o colonización saprófita. Por ejemplo, en pacientes con neutropenia febril, la detección de transcritos fúngicos de *Aspergillus spp.* en plasma, junto con una firma transcripcional del huésped asociada a la respuesta de interferón tipo I, proporciona una evidencia diagnóstica superior a cualquier cultivo, permitiendo una intervención terapéutica personalizada antes de la aparición de signos radiológicos (Nielsen et al., 2025).

6.2. Firmas de expresión génica del huésped para diferenciar etiología viral vs. bacteriana

Uno de los desafíos diagnósticos más persistentes en las unidades de cuidados intensivos y urgencias es la discriminación etiológica rápida en pacientes con sospecha de sepsis, donde hasta el 40% de los casos carecen de confirmación microbiológica tradicional (Liborio et al., 2024). La bioinformática clínica ha respondido a esta necesidad mediante el desarrollo de firmas de expresión génica del hospedador. Como bien exponen (J. Lu et al., 2025), el sistema TriVerity representa un hito en esta área al integrar un panel de 29 mARN del sistema inmune que, procesados mediante algoritmos de aprendizaje automático (machine learning), permiten clasificar la probabilidad de infección bacteriana o viral con una precisión diagnóstica superior al 95%.

El mecanismo biofísico del test TriVerity se apoya en la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) y la detección en el punto de atención (*point-of-care*). Según analizan (D. Lu et al., 2025) y (Haghighy et al., 2024), esta plataforma procesa la sangre total en aproximadamente 30 minutos, proporcionando tres puntuaciones diagnósticas, probabilidad bacteriana, probabilidad viral y severidad de la enfermedad. La arquitectura de esta firma génica trasciende la cuantificación de una sola citoquina; en su lugar, interroga redes de co-expresión que reflejan el estado de activación de neutrófilos y linfocitos, permitiendo una regla de inclusión (*rule-in*) para bacterias con una especificidad del 95% y una regla de exclusión (*rule-out*) para virus con una sensibilidad del 92% (D. Lu et al., 2025).

La integración de estas firmas en el flujo de trabajo clínico es fundamental para el manejo de la administración de antimicrobianos (*antimicrobial stewardship*). (Pinzauti et al., 2025) y (Govender et al., 2025) argumentan que la capacidad de confirmar una etiología viral en menos de una hora evita el uso inapropiado de antibióticos de amplio espectro, mitigando la presión selectiva sobre el resistoma del paciente. Además, como señalan (J. Lu et al., 2025)

y (Nielsen et al., 2025), estas firmas son robustas frente a la heterogeneidad biológica de la sepsis, manteniendo su valor diagnóstico incluso en pacientes con comorbilidades crónicas o grados variables de inmunosupresión (D. Lu et al., 2025). En última instancia, la transcriptómica del huésped actúa como un sensor biológico inteligente que traduce la complejidad de la inflamación sistémica en una decisión clínica accionable y segura (Goktas & Grzybowski, 2025).

6.3. Dinámica de la tormenta de citoquinas evaluada mediante RNA-seq directo

La tormenta de citoquinas, caracterizada por una liberación descontrolada de mediadores proinflamatorios como la interleucina-6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y las quimiocinas CXCL10, constituye el motor fisiopatológico del fallo multiorgánico en la sepsis y la neumonía grave. La evaluación de esta dinámica mediante RNA-seq directo de nanoporos ofrece una visión sin precedentes de la cinética de este evento. Tal como postulan (Van Dijk et al., 2023) y (Agustinho et al., 2024), la secuenciación de lectura larga no solo cuantifica los niveles de transcrito, sino que permite resolver el "paisaje de isoformas" que surgen durante la respuesta inmune aguda.

Tabla 7

Dinámica de la tormenta de citoquinas mediante RNA-seq directo

Componente	Qué se evalúa	Aporte del RNA-seq directo	Relevancia clínica
ARN del huésped	Moléculas de ARN presentes en la muestra clínica.	Permite analizar directamente el transcriptoma y obtener información sobre la expresión génica.	Proporciona una visión molecular de la respuesta del paciente.
Expresión génica	Incremento o disminución de la actividad transcripcional de determinados genes.	Permite identificar patrones de expresión asociados con inflamación e inmunidad.	Ayuda a caracterizar el estado de activación del sistema inmunitario.
Citoquinas	Genes relacionados con mediadores como interleucinas y otros reguladores inflamatorios.	Permite evaluar simultáneamente múltiples componentes de las redes de señalización.	Contribuye a comprender la intensidad y evolución de la respuesta inflamatoria.
Quimiocinas	Transcritos relacionados con el reclutamiento y activación de células inmunitarias.	Permite detectar cambios coordinados en su expresión.	Ayuda a interpretar procesos de movilización leucocitaria.
Interferones	Expresión de genes asociados con	Permite analizar patrones transcriptómicos	Puede aportar información sobre la respuesta del huésped

	respuestas antivirales e inmunitarias.	relacionados con señalización por interferón.	frente a determinados agentes infecciosos.
Respuesta inflamatoria	Activación de múltiples genes y vías relacionadas con inflamación.	Permite estudiar redes completas en lugar de un solo marcador.	Facilita una interpretación más amplia del estado inflamatorio.
Dinámica temporal	Cambios en la expresión génica a lo largo del tiempo.	El análisis repetido permite comparar diferentes momentos del proceso.	Puede ayudar a identificar progresión, persistencia o resolución de la respuesta.
RNA-seq directo	Secuenciación directa de moléculas de ARN mediante nanoporos.	Conserva información sobre transcritos completos y permite análisis en tiempo real.	Puede acelerar la generación de información transcriptómica.
Modificaciones del ARN	Cambios químicos presentes en determinadas moléculas de ARN.	Las plataformas de lectura directa pueden proporcionar señales compatibles con el estudio de modificaciones del ARN.	Amplía la caracterización molecular más allá de la simple expresión génica.
Redes de señalización	Relaciones entre genes y vías inmunológicas activadas.	Permite integrar múltiples genes en rutas biológicas.	Favorece una interpretación sistémica de la respuesta inmunitaria.
Correlación con proteínas	Comparación entre expresión de ARN y niveles de citoquinas circulantes.	El transcriptoma puede complementarse con mediciones proteicas.	Evita asumir que un aumento de ARN implica necesariamente un aumento equivalente de proteína.
Respuesta del huésped	Estado molecular global frente a la infección.	Permite generar perfiles transcriptómicos asociados con diferentes estados inmunitarios.	Puede complementar la información microbiológica para una evaluación integral.
Aplicación clínica	Integración del perfil molecular con signos, síntomas y otros biomarcadores.	Facilita una caracterización más amplia del estado del paciente.	Potencialmente contribuye a estrategias de medicina de precisión.

Nota: Elaboración propia a partir de (Govender et al., 2025),

El análisis de la tormenta de citoquinas mediante RNA-seq directo nos proporciona una comprensión más profunda de la inflamación, ya que este fenómeno no se debe a la acción de una única citoquina, sino que resulta de una interacción compleja entre múltiples genes, células y rutas de señalización. Con la información obtenida a través de la transcriptómica, podemos observar cómo la expresión de genes vinculados a interleucinas, interferones, quimiocinas y otros mediadores fluctúa en diversas fases de una infección.

Una de las grandes ventajas del RNA-seq directo utilizando nanoporos es su capacidad para examinar ARN de manera directa y producir datos de forma continua, lo que resulta especialmente valioso para investigar la evolución de la respuesta inmunitaria con el tiempo.

A pesar de esto, es fundamental que se interpretan estos datos de forma cuidadosa, ya que un aumento en la expresión de un gen asociado a una citoquina no significa automáticamente que haya un incremento correspondiente de la proteína activa en sangre o en los tejidos.

El análisis transcriptómica adquiere mayor relevancia cuando se complementa con mediciones proteicas, indicadores clínicos y pruebas microbiológicas. Desde este enfoque, la tecnología nos permite avanzar de una evaluación restringida de marcadores aislados hacia una caracterización más completa de las redes de respuesta del organismo, lo que podría facilitar la identificación de patrones relacionados con una inflamación severa, la evolución o la resolución del proceso, además de proporcionar una base molecular para futuras estrategias en diagnóstico y medicina personalizada.

La biofísica del RNA-seq directo permite identificar modificaciones epitranscriptómicas, específicamente la N6-metiladenosina (m^6A), que regulan el tiempo de vida media de los transcritos de citoquinas. Según el análisis crítico de (Van Dijk et al., 2023), la metilación del ARN es un regulador clave de la "resolución" de la tormenta de citoquinas; una alteración en los patrones de m^6A puede derivar en la persistencia de transcritos proinflamatorios, perpetuando el daño endotelial y la coagulopatía. La plataforma de nanoporos, al no requerir la síntesis de ADN complementario (cDNA) ni la amplificación enzimática, evita los sesgos introducidos por la polimerasa, permitiendo una medición exacta de la abundancia de mRNA mensajero en tiempo real (Nielsen et al., 2025).

Clínicamente, la monitorización de la dinámica de citoquinas mediante transcriptómica dual es vital para la estratificación del riesgo y la selección de terapias inmunomoduladores. (Rapszky et al., 2025) subrayan que marcadores como la IL-6 y la procalcitonina (PCT), aunque útiles, presentan una cinética de aumento que a menudo es precedida por cambios en los niveles de mRNA circulante. El uso de la metagenómica shotgun combinada con el análisis de la respuesta inmune permite anticipar el inicio del choque séptico. Como ilustran (D. Lu et al., 2025) y (Nielsen et al., 2025), la integración de las puntuaciones de severidad de TriVerity con la cuantificación absoluta de la carga microbiana (GPM) proporciona un marco holístico para la medicina personalizada en la UCI. Este enfoque permite identificar a los pacientes con un fenotipo "hiper-inflamatorio" que se beneficiarían de bloqueadores de citoquinas o corticoides, frente a aquellos con un estado de "inmunoparálisis" donde estas intervenciones podrían ser deletéreas (Martin-Loeches et al., 2025).

En conclusión, la transcriptómica dual representa la culminación de la bioinformática clínica aplicada a las enfermedades infecciosas. Al fusionar el análisis simultáneo del patógeno

y el paciente, validar firmas de expresión para la diferenciación etiológica y decodificar la dinámica de la tormenta de citoquinas mediante secuenciación de ARN nativo, esta disciplina dota al clínico de una inteligencia biológica profunda. Esta orquestación molecular es la que permitirá que la metagenómica shotgun se consolide no solo como una herramienta de identificación, sino como la plataforma definitiva para la gestión integral y personalizada del paciente crítico en el siglo XXI (Nielsen et al., 2025).

La medicina genómica de precisión ha trascendido la mera identificación del agente agresor para centrarse en la resolución del conflicto biológico entre el patógeno y el hospedador. Como bien exponen (Van Dijk et al., 2023), la implementación de la secuenciación de lectura larga ha permitido una captura omnisciente del flujo de información transcripcional, facilitando una "biopsia molecular" dinámica del estado inmunológico. En este contexto, la bioinformática clínica actúa como el decodificador de la interacción celular, transformando señales de ARNm en decisiones terapéuticas personalizadas (Nielsen et al., 2025).

6.4. Marcadores de agotamiento de células T en infecciones crónicas analizados por mNGS

El fenómeno del agotamiento o *exhaustion* de las células T representa un estado de disfunción efectora caracterizado por la pérdida progresiva de la capacidad de secreción de citoquinas y una alteración metabólica profunda, inducida por la exposición persistente a antígenos. En el ámbito de la metagenómica clínica, la detección de firmas transcripcionales asociadas a este estado es fundamental para el manejo de infecciones virales y bacterianas de curso crónico. Según analizan (Martin-Loeches et al., 2025), la bioinformática de nanoporos permite interrogar el perfil de expresión de receptores inhibitorios críticos, como PD-1, CTLA-4, TIM-3 y LAG-3, directamente de muestras de sangre total estabilizadas.

La mecánica de este análisis se apoya en la capacidad de la transcriptómica de nanoporos para resolver isoformas de empalme (*splicing*) que los métodos tradicionales de lectura corta no logran deconvolucionar. Tal como sugieren (Agustinho et al., 2024) y (Van Dijk et al., 2023), el agotamiento celular no se manifiesta solo como un cambio cuantitativo en los niveles de transcrito, sino como una reorganización estructural de la maquinaria de traducción del linfocito. La detección de variantes estructurales en los dominios citoplasmáticos de estas moléculas de control inmunológico proporciona una información diagnóstica de alta resolución sobre el grado de "inmunoparálisis" del paciente (Martin-Loeches et al., 2025).

La relevancia clínica de monitorizar el agotamiento de células T mediante mNGS es inmediata en la estratificación del riesgo de infecciones oportunistas. (Martin-Loeches et al., 2025) proponen un sistema de gradación de la inmunosupresión donde la expresión de marcadores de agotamiento, junto con la linfopenia persistente (recuento absoluto de linfocitos $<1000/\mu\text{L}$), define un fenotipo de "inmunosupresión severa" con alto riesgo de reactivaciones de virus como CMV o EBV. La capacidad de anticipar este fallo efector mediante la detección de transcritos como Eomes o T-bet antes de la manifestación clínica permite intervenciones preventivas de reconstitución inmune, desplazando el paradigma desde la reactividad terapéutica hacia la profilaxis genómica de precisión (Martin-Loeches et al., 2025).

6.5. Identificación de biomarcadores de sepsis temprana en el perfil de ARNm leucocitario

El diagnóstico de la sepsis se enfrenta al desafío de la heterogeneidad biológica, donde la respuesta del hospedador a menudo precede a la detección microbiológica convencional. La bioinformática clínica ha respondido mediante el desarrollo de firmas de expresión génica de 29 mARN leucocitarios, procesadas mediante algoritmos de aprendizaje automático (machine learning). Como bien detallan (D. Lu et al., 2025) y (He et al., 2024), el sistema TriVerity utiliza la tecnología LAMP integrada en biosensores portátiles para cuantificar estos biomarcadores en menos de 30 minutos, proporcionando una puntuación de probabilidad bacteriana y viral con una especificidad superior al 95%.

El fundamento biofísico de esta firma génica leucocitaria reside en la activación coordinada de redes de co-expresión vinculadas a la respuesta innata. (D. Lu et al., 2025) explican que, tras la interacción de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) con los receptores tipo Toll (TLRs), se desencadena una cascada transcripcional que altera el paisaje de ARNm en los neutrófilos y monocitos circulantes. El análisis cuantitativo de estos transcritos permite distinguir entre una respuesta inflamatoria sistémica no infecciosa (SIRS) y una sepsis verdadera. La utilización de tubos PAXgene para la lisis inmediata y preservación del ARN asegura que la señal capturada sea un reflejo fiel de la cinética inmunológica en el punto de atención (Nielsen et al., 2025).

Desde una perspectiva clínica, la identificación temprana de estos perfiles es vital para evitar el inicio del choque séptico. Como argumentan (Liborio et al., 2024) y (Martin-Loeches et al., 2025), los biomarcadores proteicos como la procalcitonina (PCT) presentan una latencia en su elevación que la transcriptómica dual puede acortar. Al integrar las puntuaciones de severidad de TriVerity con biomarcadores de daño endotelial detectables genómicamente, el

clínico puede identificar fenotipos "hiper-inflamatorios" que requieren una reanimación agresiva y terapias inmunomoduladores selectivas, optimizando así los desenlaces clínicos en las unidades de cuidados intensivos (D. Lu et al., 2025).

6.5.1. Mecanismos de evasión inmune bacteriana detectables en el transcriptoma

La patogenia microbiana no es un proceso estático, sino una orquestación activa de estrategias diseñadas para neutralizar la vigilancia del hospedador. La transcriptómica dual permite la captura simultánea de estos mecanismos de evasión bacteriana. Como analizan (Chhay et al., 2026) y (Maugeri et al., 2025), patógenos como *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta emplean la sobreexpresión de genes capsulares (como los loci KL2 o KL17) y la secreción de sideróforos (aerobactina, yersiniabactin) para ocluir los sitios de unión del complemento y competir por el hierro sistémico, respectivamente.

La bioinformática de nanoporos es capaz de detectar la activación de estos "virulomas" en tiempo real. Tal como postulan (Maugeri et al., 2025) y (Agustinho et al., 2024), la secuenciación de lectura larga facilita la identificación de genes de resistencia y virulencia flanqueados por elementos genéticos móviles, permitiendo determinar si una estrategia de evasión reside en un plásmido altamente transmisible. Además, la transcriptómica revela cómo las bacterias modulan activamente la respuesta del hospedador, por ejemplo, la detección de efectores bacterianos que inducen la degradación del complejo NF- κ B en los leucocitos explica el estado de "inmunoparálisis" observado en sepsis graves, donde la señalización proinflamatoria es silenciada activamente por el patógeno (Martin-Loeches et al., 2025).

Este interrogatorio multimodal del transcriptoma patogénico es esencial para predecir el fracaso terapéutico. (Meslier et al., 2022) y (Pinzauti et al., 2025) subrayan que la presencia genotípica de un mecanismo de resistencia debe ser validada mediante su expresión transcripcional. Un gen de carbapenemasa silente no confiere resistencia clínica; por el contrario, la detección de transcritos de bombas de eflujo y mutaciones en regiones promotoras de porinas (como OmpK36) proporciona una evidencia robusta de una evasión farmacológica activa. Esta capacidad de "fenotipado genómico" en tiempo real permite ajustar la presión antibiótica de manera dinámica, neutralizando las adaptaciones bacterianas antes de que deriven en una pan-resistencia clínica (Struelens et al., 2024).

6.5.2. Integración de datos de citoquinas plasmáticas con carga genómica microbiana

La culminación de la bioinformática clínica aplicada a la infección sistémica reside en la integración de la metrología molecular del hospedador con la cuantificación absoluta del

patógeno. Como bien demuestran (Nielsen et al., 2025), existe una correlación biológica y estadística significativa entre la carga microbiana libre de células (ccfDNA), medida en equivalentes genómicos por microlitro (GPM), y los niveles plasmáticos de mediadores proinflamatorios como la IL-6, la PCT y el TNF- α . Esta sinergia permite una visión holística de la "DNAemia" microbiana como el motor de la tormenta de citoquinas.

La mecánica de esta integración se apoya en el uso de estándares internos de ADN de cadena sencilla ("spike-ins") que permiten transformar abundancias relativas en medidas de concentración absoluta. Según el análisis de (Nielsen et al., 2025) y (Parhofer et al., 2026), una carga genómica bacteriana elevada (>100 GPM) actúa como un predictor independiente de mortalidad a los 28 días, al correlacionar con un incremento exponencial de citoquinas que exacerbaban el daño multiorgánico evaluado por el score SOFA. En un caso documentado por (Nielsen et al., 2025), la detección de *S. pneumoniae* a 3.5 GPM coincidió con niveles de IL-6 elevados, permitiendo una intervención dirigida en un paciente con neumonía grave cuyos cultivos tradicionales fueron negativos.

Clínicamente, la integración de estos datos facilita la personalización de la inmunoterapia. (Martin-Loeches et al., 2025) y (Nasrollahian et al., 2024) sugieren que los pacientes con alta carga genómica y tormenta de citoquinas concomitante se benefician de bloqueadores de receptores de citoquinas, mientras que aquellos con baja carga genómica pero firmas de agotamiento celular leucocitario podrían requerir inmunoestimulantes. La bioinformática clínica de nanoporos, al proporcionar ambos conjuntos de datos en una sola corrida de secuenciación, se consolida como la plataforma definitiva para la medicina de precisión en el paciente crítico, permitiendo un monitoreo en tiempo real de la eficacia del tratamiento tanto en la eliminación del patógeno como en la restauración de la homeostasis inmunológica (Nielsen et al., 2025).

En conclusión, la transcriptómica dual y el análisis integrado de la respuesta inmune representan el fin de la era del diagnóstico microbiológico aislado. Al fusionar la detección de marcadores de agotamiento de células T, la identificación de firmas de sepsis temprana, el mapeo de la evasión bacteriana y la integración de la carga genómica con citoquinas, esta disciplina dota al clínico de una inteligencia biológica total. Esta orquestación molecular es la que garantiza que la metagenómica shotgun de lectura larga se posicione como el nuevo estándar de oro para la gestión integral y personalizada de las enfermedades infecciosas en el siglo XXI (Nielsen et al., 2025).

La transición de la medicina crítica hacia una fase de precisión molecular ha sido impulsada por la capacidad de procesar masivamente la señal biológica del hospedador. En este contexto, la bioinformática clínica ha trascendido la mera identificación de agentes patógenos para consolidarse como una herramienta de pronóstico dinámico. Como bien exponen (D. Lu et al., 2025), la integración de flujos de trabajo metagenómicos con el análisis de la respuesta inmune molecular permite no solo diagnosticar la etiología del cuadro, sino anticipar la trayectoria clínica del paciente mediante el modelado de la disfunción orgánica. Esta arquitectura diagnóstica se apoya en biosensores de nanoporos y algoritmos de aprendizaje profundo que decodifican la complejidad de la inflamación sistémica, transformando los transcritos de ARN en métricas de severidad accionables en tiempo real (Van Dijk et al., 2023).

6.6. Modelado predictivo de fallo orgánico basado en la respuesta inmune molecular

La evaluación de la severidad en el paciente crítico ha dependido históricamente de escalas clínicas como el *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA). No obstante, el SOFA es una métrica reactiva que documenta el daño ya instaurado en sistemas fisiológicos. La bioinformática contemporánea propone un cambio hacia un modelado predictivo molecular, donde la expresión génica actúa como un indicador temprano del colapso homeostático. Según detallan (Antonopoulos et al., 2022) y (Govender et al., 2025), existe una heterogeneidad biológica profunda en la sepsis que las escalas tradicionales no logran capturar, lo que exige el uso de firmas transcriptómicas para identificar fenotipos de alto riesgo.

La implementación de paneles de 29 mRNA inmunológicos, integrados en sistemas como TriVerity, representa un hito en la metrología del fallo orgánico. Como analizan (D. Lu et al., 2025) y (Pinzauti et al., 2025), esta plataforma utiliza algoritmos de aprendizaje automático para procesar la señal de transcritos leucocitarios en menos de 30 minutos. La mecánica biofísica de esta predicción se fundamenta en la cuantificación de la activación de redes de co-expresión vinculadas a la tormenta de citoquinas y el daño endotelial (D. Lu et al., 2025) demuestran que las puntuaciones de severidad generadas molecularmente poseen una capacidad superior para pronosticar la mortalidad a los siete días y la necesidad de soporte vital en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), en comparación con los biomarcadores convencionales como el lactato o la procalcitonina (Nielsen et al., 2025).

La relevancia clínica de este modelado reside en su capacidad de estratificación anticipatoria. Al identificar a pacientes con un fenotipo "hiper-inflamatorio" caracterizado por una sobreexpresión masiva de citoquinas proinflamatorias y mediadores de coagulación, el clínico puede iniciar intervenciones de soporte hemodinámico agresivo antes de que el score

SOFA se eleve significativamente. Además, como sugieren (Martin-Loeches et al., 2025) y (He et al., 2024), el uso de la transcriptómica permite detectar el estado de "inmunoparálisis", un predictor molecular de infecciones secundarias y mortalidad tardía. Este enfoque transforma el manejo de la sepsis de un protocolo de "talla única" hacia una medicina personalizada, donde el modelado computacional de la respuesta inmune dicta la intensidad y el tipo de intervención terapéutica (Martin-Loeches et al., 2025).

6.7. Respuesta inmunitaria específica de órgano: Diferencias entre neumonía y meningitis

La bioinformática clínica ha revelado que la respuesta inmune no es un fenómeno sistémico uniforme, sino una orquestación compartimentalizada dictada por el nicho anatómico de la infección. En la diferenciación entre neumonía severa y meningitis bacteriana, la señal molecular capturada en fluidos específicos proporciona una resolución diagnóstica crítica. Como bien analizan (Q. Zhang et al., 2023) y (Y. Wang et al., 2025), en el contexto del tracto respiratorio inferior, la respuesta inmune está marcada por la liberación local de biomarcadores como el receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE) y la oncostatina M (OSM), los cuales reflejan el daño al epitelio alveolar y la activación de neutrófilos en el parénquima pulmonar.

Por el contrario, la meningitis impone un desafío biofísico único debido a la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE). La respuesta inmune en el sistema nervioso central (SNC) se caracteriza por una neuroinflamación intensa detectable en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Según detallan (Olie et al., 2024) y (Meng et al., 2025), el perfil metabolómico y transcriptómico del LCR revela la elevación de neopterina, ácido quinolínico y una alteración en el ratio kinurenina/triptófano, firmas que son virtualmente inexistentes en el compartimento pulmonar. La utilización de la secuenciación de nanoporos en LCR permite interrogar no solo el ADN microbiano, sino la expresión de citoquinas locales que median el aumento de la permeabilidad de la BHE, facilitando la identificación de patógenos en muestras de biomasa marginal (Milburn et al., 2024).

La distinción entre estas respuestas orgánicas es fundamental para la interpretación metagenómica. En la neumonía, (Q. Zhang et al., 2023) subrayan que la señal genómica del patógeno suele estar inmersa en un trasfondo de microbiota comensal orofaríngea, lo que exige el uso de umbrales diagnósticos basados en la cuantificación absoluta (GPM). En cambio, en la meningitis, cualquier señal microbiana en un sitio normalmente estéril como el SNC debe ser considerada patogénica, independientemente de la carga genómica, siempre que se descarte la contaminación por el "kit-oma" (Nielsen et al., 2025). Esta comprensión de la inmunología

de nicho es la que permite a la bioinformática clínica de nanoporos resolver casos de etiología incierta, proporcionando un marco de interpretación que integra la firma molecular del hospedador con la presencia taxonómica del agresor (Marchukov et al., 2023).

6.8. Uso de la transcriptómica para monitorizar la eficacia de la terapia inmunomodulador

La capacidad de monitorizar la respuesta dinámica al tratamiento es quizás la aplicación más disruptiva de la transcriptómica en tiempo real. En un entorno donde las terapias inmunomoduladores como los corticoides, bloqueadores de IL-6 o inmunoestimulantes como la IL-7 se utilizan de manera creciente, la bioinformática clínica provee un sistema de retroalimentación molecular. Como bien exponen (Terrones-Campos et al., 2026), el uso de corticosteroides en la UCI, aunque eficaz para mitigar la hiperinflamación, induce un sesgo hacia un perfil inmunológico Th2 que impair la depuración fúngica, incrementando el riesgo de aspergillosis pulmonar invasiva (IPA).

La monitorización transcriptómica mediante secuenciación de ARN nativo permite detectar precozmente esta vulnerabilidad. Tal como postulan (Van Dijk et al., 2023) y (Agustinho et al., 2024), la detección de modificaciones epitranscriptómicas como la N6-metiladenosina (*m⁶A*) en los transcritos de citoquinas regula su estabilidad y traducción. Una reducción en las firmas de señalización de NF- κ B y una elevación persistente de mRNA de IL-10 actúan como centinelas de una inmunosupresión iatrogénica severa. (Martin-Loeches et al., 2025) sugieren que esta monitorización permite ajustar la dosis de inmunomoduladores de manera dinámica, evitando el paso de una inflamación deletérea a una parálisis inmune que favorezca las reactivaciones virales (CMV/EBV) o coinfecciones fúngicas (Yin, s. f.).

Asimismo, el ensayo clínico IRIS-7 ha demostrado que la administración de IL-7 puede restaurar los recuentos linfocitarios en pacientes con sepsis severa. Según analizan (Liborio et al., 2024) y (Martin-Loeches et al., 2025), la eficacia de esta intervención puede ser validada molecularmente mediante la detección de una disminución en los marcadores de agotamiento de células T (PD-1, CTLA-4) analizados por mNGS. Esta capacidad de realizar una "farmacogenómica transcriptómica" en tiempo real desplaza el paradigma de la monitorización clínica tradicional hacia un control biológico absoluto de la eficacia terapéutica, asegurando que la modulación inmune alcance el equilibrio necesario para eliminar al patógeno sin exacerbar el daño tisular (Nielsen et al., 2025).

6.8.1. Controversias actuales, análisis crítico de la evidencia y perspectivas futuras

A pesar de la elegancia técnica de la metagenómica shotgun y la transcriptómica del hospedador, persisten controversias que condicionan su adopción universal. El debate más intenso se centra en la interpretación de la "DNAemia basal" y la significancia de los hallazgos genómicos en individuos con cuadros clínicos inespecíficos. Como señalan (Nielsen et al., 2025) y (Liborio et al., 2024), la ubicuidad de fragmentos de ADN microbiano en la sangre periférica de personas sanas impone la necesidad de establecer umbrales cuantitativos rigurosos. El análisis crítico de la evidencia sugiere que un resultado positivo por mNGS no es sinónimo de infección activa a menos que esté respaldado por una firma transcripcional de inflamación del hospedador y una carga genómica superior a los niveles de translocación fisiológica (Nielsen et al., 2025).

Otra controversia fundamental reside en la opacidad de los algoritmos de inteligencia artificial utilizados para el modelado de severidad. (Goktas & Grzybowski, 2025) y (Kardjadj, 2025) advierten sobre el riesgo de las "cajas negras" en el diagnóstico clínico, donde las decisiones terapéuticas se basan en puntuaciones de riesgo cuya lógica interna es inaccesible para el médico. Es imperativo transitar hacia una IA explicable (DECIDE-AI) que proporcione métricas de confianza transparentes y que esté validada en ensayos clínicos aleatorizados multicéntricos. La evidencia actual, aunque prometedora, todavía carece de grandes estudios de impacto que demuestren que la rapidez de la mNGS se traduce inequívocamente en una reducción de la mortalidad a largo plazo en todas las poblaciones (Govender et al., 2025).

Las perspectivas futuras se vislumbran en la integración de la microfluídica avanzada y el *edge computing*. (Haghyegh et al., 2024) y (S. Casimiro-Soriguer et al., 2025) anticipan el desarrollo de dispositivos portátiles "wearables" que realicen un monitoreo multimodal de la infección y la respuesta inmune directamente en la piel o fluidos intersticiales. Asimismo, la convergencia de la metagenómica con la proteómica de nanoporos permitirá una resolución de aminoácidos individuales, facilitando la detección de modificaciones postraduccionales que regulan la virulencia bacteriana en tiempo real (Van Dijk et al., 2023). En última instancia, la estandarización de marcos regulatorios globales, como el EU AI Act, asegurará que la innovación biotecnológica se traduzca en una medicina de precisión equitativa, segura y éticamente robusta para el manejo del paciente crítico (Goktas & Grzybowski, 2025).

En conclusión, la bioinformática clínica de nanoporos representa la piedra angular de la infectología del siglo XXI. Al integrar el modelado predictivo del fallo orgánico, el análisis compartimentalizado de la inmunidad y la monitorización dinámica de la terapia, esta

disciplina dota al clínico de una visión omnisciente de la patogenia. El desafío inmediato reside en la validación clínica de estos modelos y en la neutralización del ruido ambiental para garantizar que cada bit de información genómica se traduzca en una vida salvada en la primera línea de los cuidados críticos (Nielsen et al., 2025).

Capítulo VII

Diagnóstico Metagenómico de Sepsis y Choque Séptico

La sepsis, entendida fisiopatológicamente como una disfunción orgánica que pone en peligro la vida debido a una respuesta desregulada del hospedador ante la agresión microbiana, representa uno de los desafíos más formidables de la medicina crítica contemporánea (Hao et al., 2023). En el ecosistema de la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), la cinética de la intervención terapéutica es el determinante principal de la supervivencia; cada hora de retraso en la administración de un régimen antimicrobiano efectivo tras la instauración de la hipotensión se traduce en un incremento lineal y drástico de la mortalidad (Kumar et al., 2024). No obstante, el paradigma diagnóstico tradicional, basado en el cultivo microbiológico, impone una latencia biológica de entre 24 y 72 horas, un intervalo de "ceguera terapéutica" donde el clínico debe recurrir a la antibioticoterapia empírica de amplio espectro, a menudo ineficaz o excesiva (Nielsen et al., 2025). La irrupción de la secuenciación metagenómica shotgun de lectura larga (mNGS) propone una reingeniería del flujo de trabajo diagnóstico, permitiendo una transición desde la identificación basada en el crecimiento celular hacia una metrología genómica directa y agnóstica de los fluidos biológicos (Agustinho et al., 2024).

7.1. Reducción del tiempo al resultado (Time-to-Result) en la sepsis de origen desconocido

La optimización de la ventana temporal diagnóstica en cuadros de sepsis de origen incierto constituye la piedra angular de la metagenómica clínica. A diferencia de las metodologías convencionales que requieren el enriquecimiento previo del patógeno *in vitro*, la secuenciación por nanoporos interroga la señal iónica de las macromoléculas nucleotídicas en tiempo real, facilitando una transducción bioinformática casi instantánea (Van Dijk et al., 2023). Como bien demuestran (Govender et al., 2025), la implementación de flujos de trabajo optimizados ha permitido alcanzar una identificación precisa de especies en un tiempo medio de 3 horas y 20 minutos tras la detección de positividad en el hemocultivo, superando con creces la velocidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF y las pruebas bioquímicas automatizadas.

La mecánica de esta reducción del *turnaround time* reside en la integración de protocolos de preparación de bibliotecas "rápidos" y el análisis de datos *on-the-fly*. Según detallan (Pinzauti et al., 2025), el uso de sistemas robóticos de purificación de ADN, como la plataforma KingFisher, en combinación con dispositivos de secuenciación portátil GridION, permite que la captura del genoma microbiano ocurra de manera sincrónica con la translocación

iónica. En un escenario de choque séptico, donde la estabilidad hemodinámica del paciente definida por una presión arterial media ≥ 90 mmHg y una saturación de oxígeno $\geq 90\%$ pende de una precisión etiológica inmediata, la mNGS ofrece una resolución genotípica que orienta la terapia dirigida en el mismo turno asistencial en que se sospecha la infección (Govender et al., 2025).

La relevancia clínica de esta celeridad es particularmente notable en infecciones causadas por microorganismos fastidiosos o no cultivables. (Govender et al., 2025) ilustran casos donde patógenos como *Capnocytophaga canimorsus*, históricamente difíciles de aislar y asociados a mordeduras de animales, fueron identificados mediante mNGS con una confianza del 98%, permitiendo una adjudicación diagnóstica en pacientes con presentaciones atípicas y cultivos negativos. Esta capacidad de "diagnóstico genómico veloz" no solo mitiga el riesgo de fallo multiorgánico evaluado mediante el score SOFA, sino que reduce la dependencia de biomarcadores proteicos de cinética lenta, como la procalcitonina o la proteína C reactiva, posicionando a la secuencia nucleotídica como el indicador biológico de mayor fidelidad en la sepsis temprana (Nielsen et al., 2025).

7.2. Detección de bacteriemias de baja densidad mediante secuenciación profunda

La sensibilidad analítica es el principal talón de Aquiles del hemocultivo tradicional, cuya tasa de positividad puede ser inferior al 40% en pacientes que ya han recibido terapia antimicrobiana previa o que presentan infecciones por microorganismos de baja carga replicativa (Nielsen et al., 2025). La biofísica de la mNGS profunda, especialmente cuando se aplica al ADN microbiano libre de células (cfDNA) en plasma, permite superar este umbral de detección mediante la captura de fragmentos sub-genómicos residuales. Tal como analizan (Nielsen et al., 2025), el cfDNA microbiano circula en el compartimento hemático como una huella molecular persistente de la invasión tisular, incluso después de que la viabilidad del patógeno ha sido neutralizada por el sistema inmune o por antibióticos bacteriostáticos.

El fundamento técnico de esta detección de alta sensibilidad se apoya en el uso de protocolos de extracción de "ultra-bajo aporte" (ultra-low input) y la depleción selectiva del ADN del hospedador. Según el análisis crítico de (Nielsen et al., 2025), el empleo de kits especializados como el QIAmp MinElute ccfDNA facilita la concentración de polímeros microbianos en volúmenes ínfimos, maximizando la relación señal-ruido durante la secuenciación profunda. Esta metodología ha demostrado su eficacia en la identificación de patógenos como *Streptococcus pneumoniae* en pacientes con neumonía grave y cultivos

negativos, alcanzando una sensibilidad diagnóstica del 97% en comparación con un estándar de referencia compuesto (Nielsen et al., 2025).

La transformación de la mNGS de una prueba cualitativa a una herramienta de metrología diagnóstica absoluta es vital en este contexto. (Nielsen et al., 2025) proponen el uso de estándares internos de ADN de cadena sencilla ("spike-ins") para cuantificar la carga microbiana en genome-equivalentes por microlitro (GPM). Esta cuantificación absoluta permite al clínico discernir entre la "DNAemia basal" translocación fisiológica de microbiota comensal y una bacteriemia patológica de baja densidad. En el estudio observacional prospectivo de (Nielsen et al., 2025), la detección de *Pseudomonas aeruginosa* a niveles de 94 GPM en muestras de pacientes con sospecha de sepsis confirmó la etiología infecciosa horas antes de que un hemocultivo repetido resultara positivo, validando la mNGS profunda como una "biopsia líquida" infecciosa de alta resolución (Nielsen et al., 2025). Además, la detección de múltiples señales genómicas permite resolver coinfecciones polimicrobianas complejas, como la presencia concomitante de *Staphylococcus epidermidis* y virus oportunistas como el KSHV en pacientes inmunocomprometidos, un escenario que suele confundir los paneles de PCR específicos (Nielsen et al., 2025).

7.2. Impacto de la mNGS en la desescalada temprana de antibióticos en la UCI

El uso indiscriminado de carbapenémicos y otros antibióticos de último recurso en la UCI es un motor primario de la crisis de resistencia antimicrobiana (AMR) global (Nemati & Sadat, 2025). La "gestión diagnóstica" (*diagnostic stewardship*) potenciada por la metagenómica shotgun ofrece una solución biológica para racionalizar esta presión selectiva. Al proporcionar simultáneamente la identidad taxonómica y el perfil del resistoma, la mNGS permite una desescalada antibiótica dirigida en una etapa crítica del tratamiento. Como bien exponen (Meslier et al., 2022) y (Pinzauti et al., 2025), la detección temprana de la ausencia de genes de carbapenemasas como *blaKPC*, *blaNDM* o *blaVIM* faculta al clínico para retirar terapias empíricas de amplio espectro con una confianza técnica superior a la que ofrece la mera estabilidad clínica subjetiva.

La bioinformática clínica aplicada a la desescalada se fundamenta en la concordancia genotipo-fenotipo. Según el análisis de (Govender et al., 2025), las herramientas de predicción de AMR, como ResFinder y AMRFinderPlus, presentan una concordancia superior al 90% con las pruebas de susceptibilidad fenotípica (AST) en bacilos Gram negativos multirresistentes. Esta validación molecular permite que, en casos de sepsis por *Enterobacterales*, se pueda predecir la susceptibilidad a las cefalosporinas de tercera generación o a la piperacilina-

tazobactam en menos de 6 horas, permitiendo una transición hacia una terapia dirigida que reduce la toxicidad sistémica y el riesgo de infecciones secundarias por *Clostridioides difficile* (Nielsen et al., 2025).

La relevancia de este impacto se observa con mayor nitidez en el paciente inmunocomprometido. (Yin, s. f.) demuestran que, en pacientes con neutropenia febril, el uso de mNGS de plasma permitió un ajuste del régimen antibiótico en el 41.5% de los casos, facilitando tanto la escalada hacia regímenes antifúngicos en casos de aspergillosis invasiva como la desescalada en infecciones bacterianas sensibles. Esta capacidad de "fenotipado genómico" en tiempo real desplaza el dogma del tratamiento de "talla única" hacia una medicina de precisión donde la presión antibiótica se modula según la carga genómica y el perfil de resistencia detectado (Nielsen et al., 2025). En última instancia, la integración de la mNGS en los programas de optimización de antimicrobianos de la UCI no solo mejora los desenlaces clínicos individuales medidos por la reducción de la estancia hospitalaria y la mortalidad, sino que actúa como una medida de salud pública esencial para preservar la eficacia de los fármacos en la era de la multirresistencia (Peri et al., 2024).

En conclusión, el diagnóstico metagenómico de la sepsis y el choque séptico representa la culminación de la integración tecnológica entre la biofísica de poros y la infectología clínica. Al reducir drásticamente el tiempo al resultado, habilitar la detección de bacteriemias de baja densidad mediante secuenciación profunda y facilitar una desescalada antibiótica racional basada en el resistoma, esta tecnología redefine los estándares de cuidado en la UCI. La transición hacia una microbiología independiente de cultivos no es solo una mejora técnica, sino una necesidad ética y clínica para enfrentar la complejidad biológica de las infecciones críticas en el siglo XXI (Nielsen et al., 2025).

La gestión clínica de la sepsis y el choque séptico se encuentra supeditada a la celeridad del diagnóstico etiológico, dado que la instauración de una antibioticoterapia inadecuada incrementa la mortalidad de forma exponencial cada hora (Kumar et al., 2024). No obstante, el paradigma actual basado en el hemocultivo presenta limitaciones biofísicas insalvables, como la baja sensibilidad ante microorganismos fastidiosos y el impacto deletéreo de la terapia antimicrobiana previa en la viabilidad celular (Nielsen et al., 2025). La secuenciación metagenómica shotgun de nueva generación (mNGS) interviene en este escenario como una herramienta de metrología molecular profunda, capaz de interrogar el material genético total de una muestra sin los sesgos de enriquecimiento selectivo inherentes al laboratorio convencional (Govender et al., 2025).

7.3. Diagnóstico de endocarditis con cultivo negativo mediante secuenciación de válvulas

La endocarditis infecciosa con hemocultivo negativo (EICN) representa un enigma clínico donde la ausencia de crecimiento microbiano, a menudo debida a patógenos intracelulares como *Coxiella burnetii* o *Tropheryma whipplei*, imposibilita la optimización del tratamiento antimicrobiano. Como bien señalan (Shi et al., 2022) y (Rannon et al., 2025), el uso de mNGS directamente sobre tejido valvular extirpado quirúrgicamente constituye un avance disruptivo al capturar señales genómicas de microorganismos secuestrados en biofilms densos. La biofísica de esta aproximación exige una lisis mecánica vigorosa frecuentemente mediante agitación con microesferas para liberar el ADN atrapado en la matriz de fibrina y plaquetas de la vegetación valvular, seguida de una deplesi3n selectiva de ADN humano para mejorar la relaci3n se1al-ruido del pat3geno (Ahannach et al., 2021).

La relevancia de esta t3cnica radica en su capacidad para identificar no solo la especie causal, sino tambi3n sus determinantes de virulencia y resistencia en una sola corrida de secuenciaci3n. Seg3n analizan (Nielsen et al., 2025) y (Struelens et al., 2024), la reconstrucci3n de genomas completos a partir de fragmentos recuperados de v1lvulas permite realizar una vigilancia gen3mica en tiempo real, facilitando la identificaci3n de brotes y la caracterizaci3n de variantes hipervirulentas que evaden la detecci3n inmunol3gica. Adem1s, como postulan (Olie et al., 2024) y (H. Yu et al., 2025) en nichos similares como el sistema nervioso central, la mNGS de lectura larga permite diferenciar entre colonizaci3n incidental y patogenia invasiva activa al analizar la profundidad de cobertura y la integridad estructural de los fragmentos detectados, proporcionando una certidumbre diagn3stica que los m3todos moleculares espec3ficos (PCR) no pueden alcanzar debido a su estrecha ventana de detecci3n (Nielsen et al., 2025).

7.3.1. Monitorizaci3n de la din1mica del pat3geno durante la terapia antimicrobiana

La monitorizaci3n de la eficacia terap3utica en la sepsis ha dependido tradicionalmente de la respuesta cl3nica subjetiva y de la cin3tica de biomarcadores inespec3ficos. Sin embargo, la secuenciaci3n metagen3mica profunda de ADN microbiano libre de c3lulas (cfDNA) en plasma ofrece una ventana directa a la din1mica biol3gica del agresor bajo presi3n farmacol3gica. Tal como demuestran (Nielsen et al., 2025), el cfDNA persiste en la circulaci3n sist3mica incluso despu3s de que los microorganismos han perdido su viabilidad, actuando como una huella molecular de la carga infecciosa residual. La utilizaci3n de est1ndares internos de ADN de cadena sencilla ("spike-ins") permite la cuantificaci3n absoluta de esta carga en

equivalentes genómicos por microlitro (GPM), transformando la mNGS en una herramienta de farmacodinamia molecular (Nielsen et al., 2025).

La mecánica de esta monitorización se basa en la observación de la curva de aclaramiento genómico. Según analizan (Yang et al., 2026) y (Nielsen et al., 2025), una reducción rápida en los niveles de GPM correlaciona estrechamente con una respuesta favorable al tratamiento, mientras que la persistencia o el incremento de la carga genómica actúan como centinelas tempranos del fracaso terapéutico o de la emergencia de clones resistentes. Esta capacidad es vital en el manejo del paciente crítico inmunocomprometido, donde las manifestaciones clínicas de la sepsis pueden ser atenuadas; en estos pacientes, la detección de un rebote en la carga genómica de un patógeno como *Pseudomonas aeruginosa* permite el ajuste preventivo del régimen antimicrobiano horas antes de que se produzca una descompensación hemodinámica manifiesta (Nielsen et al., 2025). Además, como sugieren (H. Yu et al., 2025) y (Albitar et al., 2023), la integración de la PCR digital (dPCR) para validar dianas específicas identificadas previamente por mNGS permite una monitorización ultrasensible de la cinética de eliminación, optimizando la duración de la terapia y facilitando una desescalada segura que mitiga el riesgo de toxicidad orgánica (Nielsen et al., 2025).

7.4. Diferenciación entre translocación bacteriana y sepsis verdadera

Uno de los dilemas analíticos más complejos en la medicina intensiva es la interpretación de la presencia de ADN microbiano en sangre, un fenómeno conocido como DNAemia. Como detallan (Nielsen et al., 2025) y (Hao et al., 2023), la sangre no es un compartimento absolutamente estéril; existe una señal genómica basal proveniente de la translocación fisiológica de microbiota comensal principalmente intestinal y oral que circula de manera constante en individuos sanos. La bioinformática de nanoporos debe, por tanto, ser capaz de discriminar entre esta translocación basal y una sepsis verdadera caracterizada por una invasión patogénica activa.

Para resolver este desafío, se han propuesto umbrales diagnósticos basados en el ratio de lecturas por millón (RPM). Como analizan (Nielsen et al., 2025) y (Govender et al., 2025), un hallazgo genómico se considera clínicamente significativo cuando su RPM es al menos diez veces superior al detectado en los controles internos negativos y en los blancos de proceso del lote (el "kit-oma"). Esta rigurosidad biometrológica es fundamental para evitar el sobrediagnóstico de sepsis en pacientes que presentan una barrera hemato-entérica permeable

debido a condiciones no infecciosas, como la cirrosis hepática o el ejercicio extremo (Nielsen et al., 2025).

Tabla 8

Diferenciación entre translocación bacteriana y sepsis verdadera

Criterio	Translocación bacteriana	Sepsis verdadera	Interpretación mediante metagenómica clínica
Concepto	Paso de bacterias o componentes bacterianos desde un sitio de origen hacia otro compartimento.	Respuesta desregulada del huésped frente a una infección asociada con disfunción orgánica.	La identificación molecular debe interpretarse según el contexto clínico.
Presencia bacteriana	Puede existir presencia transitoria o de baja magnitud.	Existe una infección clínicamente relevante que desencadena respuesta sistémica.	La detección de ADN bacteriano no equivale automáticamente a infección activa.
Localización	Puede relacionarse con el desplazamiento desde barreras mucosas hacia otros compartimentos.	Puede involucrar sangre o tejidos y asociarse con un foco infeccioso definido o no identificado.	El origen y tipo de muestra son fundamentales para interpretar las lecturas.
Carga microbiana	Puede ser baja y variable.	Puede presentar una carga detectable, aunque una carga baja no excluye sepsis.	La profundidad de lectura debe analizarse junto con controles y parámetros clínicos.
Respuesta del huésped	Puede ser limitada o transitoria.	Existe una respuesta sistémica desregulada asociada con alteración fisiológica.	El perfil transcriptómico puede complementar la evaluación de la respuesta del huésped.
Inflamación	Puede no existir una inflamación sistémica significativa.	Puede existir una respuesta inflamatoria sistémica, aunque la sepsis no debe definirse únicamente por inflamación.	Los biomarcadores inflamatorios sirven como evidencia complementaria, no como criterio aislado.
Disfunción orgánica	No necesariamente está presente.	Constituye un elemento central de la definición clínica de sepsis.	La información molecular debe correlacionarse con indicadores de función orgánica.
Evolución temporal	Puede ser transitoria y resolverse sin progresión sistémica.	Puede evolucionar rápidamente y requerir intervención inmediata.	El seguimiento de muestras y señales moleculares puede aportar información longitudinal.
Contaminación	Debe considerarse especialmente cuando se detectan microorganismos en cantidades muy bajas.	También debe descartarse, especialmente en muestras de sangre.	Los controles negativos y criterios bioinformáticos son esenciales.
Resultado molecular positivo	Puede reflejar presencia de material bacteriano sin infección sistémica.	Puede aportar evidencia microbiológica	La detección debe interpretarse

		compatible con infección cuando coincide con el cuadro clínico.	conjuntamente con la evidencia clínica.
Hemocultivo	Puede ser negativo si la translocación es transitoria o la concentración es baja.	Puede ser positivo en bacteriemia, aunque un resultado negativo no excluye sepsis.	La metagenómica puede complementar, pero no necesariamente reemplazar, los métodos microbiológicos convencionales.
Respuesta transcriptómica	Puede mostrar una activación limitada o inespecífica.	Puede presentar patrones de activación inmunitaria asociados con una respuesta sistémica intensa.	El RNA-seq puede contribuir a caracterizar la respuesta del huésped.
Diagnóstico final	Requiere correlación anatómica, microbiológica y clínica.	Requiere evidencia de infección y disfunción orgánica según criterios clínicos establecidos.	La metagenómica constituye una fuente adicional de evidencia dentro de un diagnóstico integrado.

Nota: Elaboración propia a partir de (Govender et al., 2025),

La translocación de bacterias y la sepsis verdadera implica algo más que observar simplemente la existencia de material genético de bacterias. La identificación molecular puede sugerir la presencia de bacterias, pero esto no implica automáticamente que exista una enfermedad. En ocasiones, un resultado bacteriano puede ser el resultado de microorganismos que son temporales, ADN fragmentado, contaminación o colonización. Por otro lado, al referirnos a la sepsis, el descubrimiento de microorganismos debe ser evaluado junto con la existencia de una infección que tenga relevancia clínica y con indicadores de disfunción orgánica.

La secuenciación Nanopore resulta muy beneficiosa, ya que proporciona información rápida sobre los microorganismos presentes y, dependiendo de la muestra y el método analítico, también puede ofrecer datos sobre su número y propiedades genéticas. Sin embargo, su verdadero potencial se revela cuando se combinan estos datos con la evolución del paciente, los resultados microbiológicos convencionales, biomarcadores y parámetros de la función orgánica. Además, incorporar el análisis transcriptómica del huésped puede enriquecer esta evaluación al mostrar cómo se activa la respuesta inmunitaria, permitiendo no solo responder a la pregunta de “¿qué microorganismos están presentes? ”, sino también a “¿cómo está reaccionando el organismo a ellos? ”.

Así, un sistema de diagnóstico basado en metagenómica clínica debería establecer criterios que diferencien entre la simple presencia de bacterias y una infección sistémica que

realmente sea relevante, ayudando a disminuir el riesgo de sobrediagnóstico y a identificar de manera más precisa a los pacientes que efectivamente tienen sepsis y requieren atención inmediata.

La distinción entre ambos fenómenos se apoya, además, en el análisis del microbioma circulante total. Según exponen (Ahannach et al., 2021) y (Marchukov et al., 2023), la sepsis verdadera suele caracterizarse por el predominio de una sola especie con una alta carga genómica y una cobertura genómica uniforme, mientras que la translocación fisiológica presenta una señal polimicrobiana de baja densidad y fragmentación errática. La capacidad de la mNGS de lectura larga para resolver fragmentos ultra-largos facilita esta discriminación al permitir el mapeo preciso de las secuencias contra genomas de referencia completos, asegurando que el clínico pueda diferenciar entre el ruido biológico y la señal patogénica que requiere intervención inmediata (Nielsen et al., 2025).

7.4.1. Integración de procalcitonina y lactato con el conteo de lecturas metagenómicas

La culminación de la precisión diagnóstica en el choque séptico reside en la integración multimodal de los parámetros hemodinámicos, los biomarcadores de respuesta del hospedador y la carga genómica microbiana. Como bien argumentan (D. Lu et al., 2025) y (Hao et al., 2023), la procalcitonina (PCT) y el lactato sérico, aunque son pilares en la UCI, proporcionan una información incompleta cuando se analizan de forma aislada. El lactato refleja el grado de hipoperfusión tisular y la disfunción metabólica anaeróbica, mientras que la PCT es un indicador de la activación inmune inducida por toxinas bacterianas; la adición del conteo de lecturas metagenómicas (GPM) completa este rompecabezas al proporcionar la magnitud de la biomasa del agresor (Nielsen et al., 2025).

La mecánica biofísica de esta integración ha sido validada mediante modelos de regresión logística que evalúan el pronóstico a los 28 días. Según el análisis de (S. Jiang et al., 2024) y (J. Lu et al., 2025), existe una correlación estadística potente entre la elevación de la carga genómica bacteriana y los niveles de lactato ≥ 2.0 mmol/L, lo que sugiere que la intensidad de la DNAemia es un impulsor directo del daño mitocondrial y el fallo multiorgánico evaluado por el score SOFA (Nielsen et al., 2025). El estudio prospectivo de (Nielsen et al., 2025) demostró que pacientes con neumonía neumocócica que presentaban una carga de 3.5 GPM y una PCT elevada tuvieron un desenlace favorable tras una intervención precoz, validando que el conteo de lecturas actúa como un factor multiplicador de la certidumbre diagnóstica.

Además, la integración de estos datos facilita la estratificación del riesgo y la personalización de la reanimación. Como sugieren (D. Lu et al., 2025) y (Martin-Loeches et al., 2025), un fenotipo caracterizado por alta carga genómica, lactato persistente y una firma transcriptómica del huésped hiper-inflamatoria define a un paciente en riesgo inminente de choque séptico refractario, exigiendo un soporte hemodinámico agresivo y terapias inmunomoduladores específicas. Esta orquestación molecular es la que permite que la metagenómica shotgun trascienda su rol de prueba de identificación para convertirse en un sensor biológico inteligente, capaz de guiar la medicina de precisión en los límites de la supervivencia biológica (Nielsen et al., 2025).

En conclusión, el diagnóstico metagenómico de la sepsis representa una revolución en la ingeniería clínica del cuidado crítico. Al resolver casos de endocarditis con cultivo negativo, monitorizar la cinética del patógeno durante el tratamiento, distinguir la DNAemia fisiológica de la sepsis invasiva e integrar los biomarcadores clásicos con la metrología genómica, esta tecnología dota al intensivista de una visión omnisciente. El desafío futuro reside en la estandarización universal de estos modelos predictivos y en la democratización del acceso a biosensores de nanoporos, garantizando que la información genómica de alta resolución se traduzca en una reducción sistémica de la mortalidad por sepsis a nivel global (Nielsen et al., 2025).

La arquitectura diagnóstica de la medicina crítica contemporánea atraviesa una transición disruptiva, desplazando el eje de gravedad desde la observación fenotípica del crecimiento microbiano hacia la metrología genómica y transcriptómica profunda. En este contexto, la sepsis no se conceptualiza únicamente como un evento infeccioso, sino como un colapso homeostático multiorgánico derivado de una señalización inmunológica desbordada ante la invasión biológica (Peri et al., 2024). Como bien exponen (Nielsen et al., 2025) y (Govender et al., 2025), la integración de la secuenciación metagenómica shotgun (mNGS) permite resolver la latencia biológica impuesta por el cultivo convencional, instaurando un modelo de diagnóstico agnóstico que interroga la totalidad del material genético circulante en el compartimento hemático (Nielsen et al., 2025).

7.4.2. Implementación de la mNGS en el flujo de trabajo del servicio de urgencias

La operatividad de la metagenómica clínica en el servicio de urgencias exige una orquestación tecnológica que actúe en las fronteras de la temporalidad biológica de la infección aguda. La fase inicial de atención en urgencias, denominada frecuentemente la "hora de oro",

es el intervalo crítico donde la identificación de una respuesta inmune desregulada decide el pronóstico vital. En este escenario, la implementación de biosensores portátiles que ejecutan paneles de expresión génica del hospedador, como el TriVerity, representa un hito en la medicina de precisión. Tal como analizan (D. Lu et al., 2025), este sistema utiliza la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para cuantificar 29 mensajeros de ARN (mARN) leucocitarios en menos de 30 minutos, proporcionando una resolución diagnóstica superior al 95% para distinguir entre una inflamación sistémica no infecciosa y una sepsis verdadera (D. Lu et al., 2025).

La mecánica biofísica de esta integración en el punto de atención (*point-of-care*) requiere protocolos de estabilización inmediata del ARN mediante tubos PAXgene, los cuales previenen la degradación enzimática de la señal transcripcional por nucleasas exógenas (D. Lu et al., 2025). Como postulan (He et al., 2024) y (Haghighat et al., 2024), la captura de estas firmas moleculares permite al urgenciólogo anticipar la trayectoria hacia el choque séptico antes de que los biomarcadores hemodinámicos o bioquímicos tradicionales como el lactato sérico ≥ 2.0 mmol/L o la elevación de la procalcitonina sean detectables (D. Lu et al., 2025). Además, la capacidad de la mNGS para identificar patógenos fastidiosos directamente del ADN microbiano libre de células (ccfDNA) en plasma facilita un triaje microbiológico veloz, logrando identificar agentes etiológicos inusuales, como *Capnocytophaga canimorsus* en casos de mordeduras, en una fracción del tiempo requerido por el hemocultivo (Nielsen et al., 2025). Esta agilidad analítica permite que el flujo de trabajo de urgencias evolucione de una lógica reactiva a una vigilancia genómica proactiva, optimizando la asignación de recursos en la unidad de cuidados intensivos (UCI) (Struelens et al., 2024).

7.5. Coste-efectividad de la metagenómica en la reducción de la estancia hospitalaria

La evaluación económica doctoral de la mNGS trasciende el análisis simplista del coste de los reactivos para centrarse en la reducción sistémica del coste total del episodio de cuidado. Aunque la secuenciación de nanoporos conlleva una inversión inicial significativa, su rentabilidad se manifiesta a través del acortamiento de las estancias en la UCI y la mitigación de complicaciones iatrogénicas. Como bien argumentan (Tian et al., 2026) y (Q. Zhang et al., 2023), la precisión diagnóstica alcanzada en las primeras seis horas de hospitalización permite una desescalada antibiótica dirigida, lo que reduce de manera drástica la incidencia de fallo renal agudo secundario a fármacos nefrotóxicos y previene la emergencia de infecciones oportunistas por *Clostridioides difficile* (Nielsen et al., 2025).

La metrología de esta coste-efectividad se apoya en la reducción del intervalo de hospitalización inefectiva. Según el análisis de (Yin, s. f.) y (Govender et al., 2025), el ajuste precoz del tratamiento antimicrobiano en el 41.5% de los pacientes inmunocomprometidos acelera la resolución de la disfunción orgánica, compensando el coste del test metagenómico mediante el ahorro de menos de 48 horas de soporte ventilatorio o hemodinámico (Govender et al., 2025). Tal como señalan (Parhofer et al., 2026) y (Nielsen et al., 2025), la rapidez en la identificación genómica correlaciona inversamente con la acumulación de la puntuación SOFA; al minimizar el tiempo de exposición a una carga microbiana crítica, se previene el daño multiorgánico refractario, el cual constituye el impulsor principal de los costes hospitalarios catastróficos (Nielsen et al., 2025). Desde la perspectiva de la salud pública, la vigilancia genómica en tiempo real proporcionada por dispositivos portátiles previene brotes intrahospitalarios de patógenos pan-resistentes, cuyo impacto económico y social es incalculable, alineando la innovación biotecnológica con los objetivos de sostenibilidad de los sistemas sanitarios modernos (Struelens et al., 2024).

7.6. Sepsis fúngica: Ventajas de la mNGS en la detección de *Candida auris* y mohos

El diagnóstico de la sepsis fúngica representa uno de los mayores desafíos biofísicos en la microbiología clínica, dada la baja sensibilidad de los hemocultivos tradicionales para detectar hongos filamentosos y especies emergentes multirresistentes. En este contexto, la mNGS de lectura larga ofrece una ventaja analítica disruptiva al interrogar directamente el material genético sin depender de la viabilidad celular (Terrones-Campos et al., 2026). Como bien analizan (Q. Zhang et al., 2023), la optimización de los protocolos de lisis celular fúngica como el protocolo C002, que integra homogeneización mecánica vigorosa con microesferas de circonio es fundamental para romper la integridad de la pared de quitina y glucanos, permitiendo la liberación de polímeros genómicos que de otro modo permanecerían secuestrados (Q. Zhang et al., 2023).

En el caso de *Candida auris*, un patógeno caracterizado por su capacidad de evasión inmunológica y resistencia a múltiples antifúngicos, la mNGS de nanoporos facilita una identificación taxonómica exacta que supera los límites de la espectrometría de masas MALDI-TOF, la cual a menudo genera clasificaciones erróneas dentro del complejo *C. haemulonii* (Govender et al., 2025). Además, la capacidad de generar lecturas ultra-largas permite mapear variaciones estructurales en genes como *ERG11* y *FKS1*, proporcionando un perfil de susceptibilidad predictivo que guía la elección terapéutica semanas antes de que el hongo sea visible en el laboratorio (Manzoor et al., 2025). Para los mohos invasores como *Aspergillus*

fumigatus y especies de Mucorales, la relevancia clínica de la mNGS reside en su capacidad diagnóstica en el paciente crítico no neutropénico sometido a terapias inmunomoduladores. Tal como exponen (Terrones-Campos et al., 2026) y (Yin, s. f.), el aumento del uso de corticosteroides en la UCI ha generado un nuevo grupo de riesgo para la aspergilosis pulmonar invasiva (IPA); en estos pacientes, la detección de señales genómicas fúngicas en plasma ccfDNA permite iniciar el tratamiento dirigido mucho antes de la aparición de signos radiológicos clásicos, impactando directamente en la supervivencia (Nielsen et al., 2025).

7.7. Controversias actuales, análisis crítico de la evidencia y perspectivas futuras

A pesar de la robustez técnica de la secuenciación de molécula única, la adopción sistémica de la mNGS enfrenta controversias epistemológicas que condicionan su aplicabilidad universal. El debate más intenso se centra en la interpretación de la "señal genómica microbiana basal" o DNAemia fisiológica. Como analizan (Nielsen et al., 2025) y (Ciaparrone et al., 2024), la ubicuidad de fragmentos de ADN microbiano en la sangre de individuos sanos impone el reto de definir umbrales de significancia clínica que no deriven en un sobrediagnóstico y sobretratamiento antimicrobiano (Nielsen et al., 2025). El análisis crítico de la evidencia sugiere que la positividad metagenómica debe ser adjudicada integrando biomarcadores de inflamación del hospedador y la cuantificación absoluta de la carga microbiana (GPM), utilizando estándares internos ("spike-ins") para normalizar la señal frente al trasfondo genómico basal (Nielsen et al., 2025).

Otra controversia fundamental reside en el fenómeno del "kit-oma" o contaminación ambiental por ADN residente en los reactivos. (Albitar et al., 2023) y (Nielsen et al., 2025) advierten que la sensibilidad extrema de los secuenciadores de nanoporos exige el uso de controles negativos rigurosos y algoritmos bioinformáticos de deplesión digital para evitar falsos diagnósticos (Nielsen et al., 2025). Asimismo, la opacidad de los modelos de inteligencia artificial (IA) utilizados en la predicción de severidad genera escepticismo en la comunidad médica. Como argumentan (Goktas & Grzybowski, 2025), es imperativo transitar hacia una IA explicable (XAI) validada en ensayos clínicos aleatorizados multicéntricos que garantice que el razonamiento automatizado sea supervisado por el juicio clínico doctoral (Goktas & Grzybowski, 2025).

Las perspectivas futuras se vislumbran en la convergencia de la metagenómica con la transcriptómica dual y la proteómica de nanoporos. (Van Dijk et al., 2023) y (Haghighat et al., 2024) anticipan el desarrollo de biosensores portátiles "wearables" que realicen una

monitorización multimodal de la infección y la respuesta inmune directamente en la piel o fluidos intersticiales, permitiendo una medicina de precisión ubicua (Van Dijk et al., 2023). En última instancia, la estandarización de marcos regulatorios como el EU AI Act proporcionará la gobernanza necesaria para asegurar que la información genómica de alta resolución se traduzca en una reducción sistémica de la mortalidad global por enfermedades infecciosas en el siglo XXI (Struelens et al., 2024).

En conclusión, el diagnóstico metagenómico de la sepsis y el choque séptico representa la culminación de la integración tecnológica entre la biofísica de poros, la computación avanzada y la infectología clínica. Al optimizar el flujo de trabajo en urgencias, demostrar su coste-efectividad mediante la reducción de estancias hospitalarias inefectivas y resolver la identidad de patógenos fúngicos complejos, esta tecnología dota al clínico de una visión omnisciente. El desafío reside en la validación clínica de estos modelos y en la neutralización del ruido ambiental para garantizar que cada bit de información genómica se traduzca en una vida salvada en la primera línea de la emergencia médica (Nielsen et al., 2025).

Capítulo VII

Neuro-Metagenómica: Infecciones del Sistema Nervioso Central

La neuro-infectología contemporánea se enfrenta a una paradoja biometrológica sustancial, el sistema nervioso central (SNC), protegido por la barrera hematoencefálica (BHE) y considerado históricamente un santuario biológico estéril, presenta uno de los mayores desafíos para el diagnóstico microbiológico convencional debido a la biomasa marginal de los agentes agresores y a la inaccesibilidad relativa de los tejidos afectados. Como bien analizan (Milburn et al., 2024) y (Olie et al., 2024), el paradigma del diagnóstico sindrómico ha sido desplazado por la neuro-metagenómica, una disciplina que emplea la secuenciación de lectura larga para interrogar de forma agnóstica el flujo de ácidos nucleicos en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Esta metodología no solo permite la desarticulación de las limitaciones del cultivo, sino que redefine la arquitectura diagnóstica al integrar la señal del patógeno con la respuesta inmunológica compartimentalizada del huésped, facilitando una resolución etiológica en cuadros de meningitis y encefalitis que anteriormente se catalogaban como idiopáticos (Milburn et al., 2024).

8.1. Superación de las limitaciones del cultivo de LCR en meningitis crónicas

La meningitis crónica, definida por la persistencia de signos meníngeos y pleocitosis en el LCR durante un intervalo superior a las cuatro semanas, constituye uno de los enigmas más complejos en la medicina crítica y la neurología. El estándar de oro histórico, fundamentado en el aislamiento celular mediante cultivo, presenta una sensibilidad analítica alarmantemente baja, especialmente cuando el cuadro es mediado por microorganismos fastidiosos como *Mycobacterium tuberculosis* o bacterias anaerobias estrictas. Según detallan (Olie et al., 2024), la baja tasa de replicación de estos patógenos en medios artificiales, sumada al efecto inhibitorio de la terapia antimicrobiana empírica administrada antes de la punción lumbar, deriva en una "ceguera microbiológica" que puede superar el 60% de los casos.

La biofísica de la neuro-metagenómica shotgun de nanoporos interviene en este escenario al eliminar la obligatoriedad de la viabilidad celular. Tal como postulan (Nielsen et al., 2025) y (Agustinho et al., 2024), la secuenciación de molécula única detecta fragmentos de ADN microbiano libre de células (cfDNA) que persisten en el espacio subaracnoideo incluso tras la neutralización del patógeno por el sistema inmunitario. En el contexto específico de la tuberculosis meníngea, donde la carga bacilar es extremadamente reducida, la secuenciación profunda permite capturar firmas genómicas que evaden incluso la sensibilidad de la PCR

específica como el GeneXpert MTB/RIF Ultra. (Wallraven et al., 2026) argumentan que la mNGS de lectura larga facilita la reconstrucción de genomas completos a partir de fragmentos ultracortos, permitiendo no solo la identificación de la especie, sino la detección de polimorfismos en genes como *rpoB* o *katG*, determinantes de la resistencia a fármacos antituberculosos, en una fracción del tiempo requerido por el cultivo en medio líquido (Milburn et al., 2024).

Además, la mecánica del procesamiento de la muestra en neuro-metagenómica exige protocolos de depleción selectiva de ADN humano para compensar la alta celularidad inflamatoria del LCR. Según analizan (Jia et al., 2024) y (Agustinho et al., 2024), el uso de técnicas de lisis diferencial y el tratamiento con nucleasas antes de la extracción de ácidos nucleicos totales incrementa la sensibilidad diagnóstica en varios órdenes de magnitud, permitiendo que la señal iónica del patógeno sea discriminada del trasfondo genómico del hospedador. Esta orquestación técnica es vital para el diagnóstico de meningitis decapitadas por antibióticos, donde la mNGS ha demostrado una concordancia diagnóstica superior al 95% frente a estándares clínicos compuestos, transformando el manejo de la meningitis crónica de un ejercicio de exclusión empírica a una intervención de precisión genómica (Nielsen et al., 2025).

8.2. Detección de encefalitis virales raras y virus neurotrópicos emergentes

La encefalitis aguda representa una emergencia médica donde la latencia diagnóstica correlaciona directamente con secuelas neurológicas irreversibles y una mortalidad que puede exceder el 20%. Los paneles de PCR multiplexados actuales, aunque veloces, presentan una "ventana de ceguera" al estar limitados a un número finito de dianas virales predefinidas. Como bien señalan (Coll et al., 2024) y (Benoit et al., 2024), la neuro-metagenómica shotgun rompe esta restricción al actuar como un detector omnisciente capaz de identificar cualquier virus presente en el LCR sin objetivos *a priori*. Esta agosticidad taxonómica es fundamental para la vigilancia de virus neurotrópicos emergentes o variantes inusuales de virus comunes que presentan cuadros clínicos atípicos.

La biofísica de la secuenciación de lectura larga de nanoporos es particularmente ventajosa para la virología del SNC. Al generar lecturas que atraviesan genomas virales completos, el sistema permite diferenciar entre virus con alta homología de secuencia pero con perfiles de patogenicidad divergentes. Tal como ilustran (S. Casimiro-Soriguer et al., 2025) y (Struelens et al., 2024), en brotes de arbovirosis como el virus del Nilo Occidental (WNV) o el

virus Zika, la mNGS facilitó la caracterización filogenética de linajes específicos en tiempo real, permitiendo rastrear la dinámica de transmisión neurotrópica. En un caso emblemático reportado por (Jia et al., 2024), el uso de metagenómica permitió la identificación accionable de *Leptospira santarosai* en un paciente con encefalitis recurrente cuyos resultados de laboratorio convencionales habían sido persistentemente negativos durante meses, validando el impacto de esta tecnología en la resolución de crisis diagnósticas (Milburn et al., 2024).

Complementariamente, para virus con carga genómica efímera o títulos ultra-bajos, se han implementado flujos de trabajo de enriquecimiento viral como el VIDISCA-NGS. Según el análisis de (Huang et al., 2026), esta metodología emplea la amplificación de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción de cDNA para concentrar la señal viral frente al rARN humano dominante. La integración de estos algoritmos con el llamado de bases en tiempo real permite que la detección de una "amenaza viral" ocurra en menos de seis horas tras la recolección del LCR. Esta celeridad es crítica para el manejo de virus como el de la rabia o el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), donde la identificación temprana de la secuencia nucleotídica permite la implementación de medidas de salud pública y ajustes terapéuticos antivirales de soporte en ventanas temporales diagnósticas inaccesibles para la serología o el cultivo viral (Struelens et al., 2024).

8.3. Análisis de la microbiota del SNC

Uno de los debates epistemológicos más intensos en la microbiología moderna es la cuestionabilidad del dogma de la esterilidad absoluta del SNC. La irrupción de secuenciadores de nanoporos con sensibilidad a nivel de molécula única ha revelado la presencia esporádica de ácidos nucleicos microbianos en el LCR de individuos sin evidencia clínica de infección. Como analizan (Tian et al., 2026) y (Nielsen et al., 2025), la existencia de una "microbiota del SNC" es un concepto polémico que debe distinguirse rigurosamente del fenómeno de la DNAemia basal y de la translocación fisiológica de fragmentos genómicos desde nichos mucosos periféricos.

La bioinformática clínica impone criterios de adjudicación doctoral para discernir entre ruido biológico y patogenia verdadera. (Nielsen et al., 2025) proponen que la presencia de trazas de ADN bacteriano en LCR puede ser el resultado de un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica inducida por condiciones no infecciosas, permitiendo la infiltración pasiva de cfDNA microbiano circulante. Para mitigar el riesgo de falsos diagnósticos, es imperativo el uso de umbrales cuantitativos basados en el ratio de lecturas por

millón (RPM). Un hallazgo se considera clínicamente relevante solo cuando su RPM supera diez veces el nivel detectado en los controles internos negativos, el denominado "kit-oma" (Nielsen et al., 2025).

Tabla 9

Análisis metagenómico de la microbiota del SNC

Aspecto	Característica	Aporte de la metagenómica Nanopore	Precaución diagnóstica
Muestra clínica	Puede incluir líquido cefalorraquídeo (LCR) u otras muestras relacionadas con el SNC.	Permite analizar directamente el material genético presente.	La selección y conservación de la muestra pueden determinar la calidad del resultado.
Carga microbiana	Generalmente puede ser muy baja en comparación con el ADN del huésped.	La secuenciación puede detectar señales microbianas incluso cuando son difíciles de recuperar mediante cultivo.	Una señal de baja abundancia requiere controles y confirmación.
ADN del huésped	Puede representar una proporción importante del material total.	La bioinformática permite separar lecturas humanas de las microbianas.	Una elevada cantidad de ADN humano puede disminuir la sensibilidad del análisis.
Identificación taxonómica	Determina los microorganismos cuyas secuencias están presentes.	Permite identificar múltiples taxones en una misma muestra.	La identificación molecular no demuestra automáticamente infección.
Bacterias	Pueden ser agentes causales de meningitis y otras infecciones del SNC.	Permite identificar especies y potencialmente genes relevantes.	Debe descartarse contaminación procedente del ambiente o del procedimiento.
Virus	Constituyen causas importantes de encefalitis y meningitis.	Permite buscar simultáneamente diferentes agentes virales.	Debe diferenciarse material viral residual de infección activa.
Hongos	Pueden producir infecciones neurológicas, especialmente en determinados pacientes.	Permite ampliar la búsqueda más allá de los microorganismos cultivables.	La baja carga puede dificultar la interpretación.
Abundancia relativa	Indica la proporción de lecturas asignadas a cada microorganismo.	Permite comparar la representación de diferentes taxones.	No debe interpretarse directamente como carga absoluta sin normalización adecuada.
Controles negativos	Muestras sin material clínico o controles de proceso.	Permiten identificar señales potencialmente contaminantes.	Son fundamentales cuando se trabaja con muestras de baja biomasa.

Cobertura genómica	Porcentaje del genoma microbiano representado por las lecturas.	Puede fortalecer la identificación cuando existe cobertura suficiente y específica.	La cobertura debe interpretarse junto con identidad y calidad de las lecturas.
Respuesta del huésped	Cambios inmunológicos y transcriptómicos asociados con la infección.	Puede complementarse con análisis de ARN del huésped.	La respuesta inmunitaria no identifica por sí sola al agente causal.
Diagnóstico diferencial	Permite considerar múltiples agentes infecciosos simultáneamente.	Reduce la dependencia de una búsqueda dirigida exclusivamente a un patógeno.	Los resultados requieren correlación con la presentación clínica.
Tiempo de respuesta	El diagnóstico convencional puede requerir tiempo para cultivo o pruebas sucesivas.	Nanopore permite generar e interpretar datos durante la secuenciación.	La rapidez no sustituye la validación ni la interpretación clínica.
Aplicación clínica	Apoyo al diagnóstico de meningitis, encefalitis y otras infecciones neurológicas.	Puede ampliar el espectro de agentes investigados.	Debe utilizarse como parte de una estrategia diagnóstica integrada.

Nota: Elaboración propia a partir de (Govender et al., 2025),

El estudio de la microbiota en el sistema nervioso central mediante herramientas metagenómicas es un método intrigante, pero también uno que exige una gran rigurosidad en los procedimientos. Esto ocurre porque las muestras del sistema nervioso suelen contar con una cantidad reducida de biomasa microbiana y una elevada proporción de material genético humano, lo que puede provocar que pequeñas contaminaciones se confundan con señales biológicas reales.

La secuenciación Nanopore se destaca como una excelente aliada, ya que permite ampliar la búsqueda de microorganismos y acceder a información genética de manera instantánea. Esto resulta particularmente beneficioso en situaciones de meningitis o encefalitis de causa desconocida. Al hallar una secuencia bacteriana, viral o fúngica, es fundamental examinarla considerando su abundancia, cobertura, especificidad, presencia en controles negativos, localización de la muestra y su conexión con las manifestaciones clínicas.

La verdadera fuerza de esta técnica radica en la combinación de la identificación taxonómica, la profundidad de lectura, el análisis de contaminantes, la caracterización genómica y la reacción del huésped. No debemos dar por sentado que cualquier microorganismo detectado forma parte de una microbiota estable o que necesariamente provoca una enfermedad.

En el punto de vista nos permite explorar el SNC desde una perspectiva molecular más amplia, donde la información obtenida a través de la secuenciación se convierte en un elemento fundamental en el diagnóstico diferencial y puede facilitar la identificación de agentes infecciosos que suelen ser pasados por alto con métodos tradicionales.

El análisis crítico de (Ahannach et al., 2021) subraya que la supuesta microbiota del SNC suele carecer de una firma transcriptómica de replicación activa. Mientras que en una meningitis verdadera se observa un enriquecimiento de ARNm microbiano y una respuesta inflamatoria molecular del hospedador detectable mediante firmas de citoquinas en LCR, la presencia de ADN ambiental o translocado carece de este correlato funcional. Por lo tanto, en la práctica doctoral, la noción de una microbiota residente en el cerebro se considera actualmente más un artefacto de la ultra-sensibilidad técnica que una entidad biológica funcional. La relevancia diagnóstica reside en la capacidad del clínico para interpretar estos datos integrando los biomarcadores de neuroinflamación neopterinina y ácido quinolínico, asegurando que la detección genómica sea interpretada siempre dentro del contexto de la claudicación de la barrera hematoencefálica (Nielsen et al., 2025).

8.4. Identificación de neuroparásitos y hongos dimórficos mediante mNGS

La identificación de parásitos y hongos dimórficos en el SNC representa la frontera final de la metagenómica diagnóstica. Patógenos como *Toxoplasma gondii*, *Taenia solium* (neurocisticercosis) y hongos como *Coccidioides immitis* o *Histoplasma capsulatum* imponen un desafío biofísico único debido a la complejidad estructural de sus paredes celulares y a la magnitud de sus genomas eucariotas, que suelen eclipsar las pequeñas lecturas de la secuenciación convencional. Como bien argumentan (Milburn et al., 2024) y (H. Yu et al., 2025), la secuenciación de lectura larga (LRS) es la única herramienta capaz de atravesar las regiones repetitivas y los operones ribosomales de estos microorganismos, facilitando una discriminación taxonómica exacta a nivel de especie.

En el caso de la toxoplasmosis cerebral, una complicación devastadora en el paciente con SIDA o inmunosupresión severa, la mNGS de nanoporos ha demostrado una sensibilidad superior a la PCR convencional dirigida contra el gen B1. Tal como detallan (Milburn et al., 2024) y (Segui-Perez et al., 2025), la captura agnóstica de fragmentos genómicos permite identificar dianas más sensibles, como el gen GRA7, cuya expresión ocurre durante todos los estadios del ciclo de vida del parásito. La mecánica de esta detección se fundamenta en la capacidad de los poros R10 para resolver variantes de un solo nucleótido en el genoma del

parásito, permitiendo diferenciar entre cepas de reactivación y nuevas infecciones (Milburn et al., 2024).

Para los hongos dimórficos y filamentosos, la relevancia clínica de la metagenómica radica en la optimización de los protocolos de lisis mecánica. (Q. Zhang et al., 2023) y (Terrones-Campos et al., 2026) subrayan que el uso de homogeneización con microesferas de circonio es indispensable para romper la integridad de la matriz de quitina fúngica, liberando polímeros de ADN que de otro modo permanecerían secuestrados en las vegetaciones o granulomas cerebrales. La mNGS de lectura larga permite detectar señales genómicas fúngicas en LCR incluso cuando los cultivos son negativos debido al secuestro tisular del hongo. Como postulan (Olie et al., 2024) y (J. Zhao et al., 2025), la identificación de transcritos de factores de virulencia fúngicos proporciona una evidencia definitiva de invasión parenquimatosa, permitiendo el inicio de terapias antifúngicas dirigidas con voriconazole o anfotericina B liposomal semanas antes de que la morfología histológica o el cultivo confirmen la etiología (Q. Zhang et al., 2023).

En conclusión, la neuro-metagenómica impulsada por la secuenciación de nanoporos representa la culminación de la integración tecnológica en el diagnóstico de infecciones del SNC. Al superar las limitaciones del cultivo en meningitis crónicas, habilitar la detección de virus emergentes, deconstruir el mito de la microbiota cerebral mediante umbrales cuantitativos y resolver la identidad de parásitos y hongos complejos, esta disciplina posiciona al genoma microbiano como el eje central de la neurología infecciosa del siglo XXI. La transición hacia una medicina diagnóstica independiente de la viabilidad celular garantiza que cada bit de información genómica se traduzca en una preservación de la integridad neurológica del paciente crítico (Nielsen et al., 2025).

La neuro-infectología contemporánea se halla en una encrucijada epistemológica donde las manifestaciones clínicas de la inflamación del sistema nervioso central (SNC) cefalea, fiebre, pleocitosis y alteración del sensorio resultan insuficientes para discernir entre agresiones biológicas y procesos neuro-inflamatorios de base inmunológica. Históricamente, el diagnóstico sindrómico ha operado bajo una ceguera técnica impuesta por la baja sensibilidad de los cultivos y la estrecha ventana de detección de los paneles de PCR multiplexados (Milburn et al., 2024). La irrupción de la metagenómica shotgun de nueva generación (mNGS) de lectura larga ha instaurado un modelo de "neuro-vigilancia molecular" que permite el interrogatorio agnóstico del flujo de ácidos nucleicos en el líquido cefalorraquídeo (LCR),

superando los sesgos de enriquecimiento selectivo y transformando la anatomía patológica molecular en una herramienta de intervención clínica en tiempo real (Benoit et al., 2024).

8.5. Diagnóstico diferencial molecular en procesos autoinmunes vs. infecciosos

La distinción entre una neuro-infección activa y una encefalitis autoinmune constituye uno de los mayores desafíos en las unidades de cuidados intensivos neurológicos. Fisiopatológicamente, ambos procesos pueden desencadenar una barrera hematoencefálica (BHE) permeable, lo que resulta en una trasudación de proteínas plasmáticas y una migración leucocitaria inespecífica al compartimento subaracnoideo. Como bien analizan (Benoit et al., 2024) en su análisis de siete años de rendimiento clínico, hasta un 20% de los pacientes inicialmente sospechosos de infección del SNC terminan recibiendo un diagnóstico de etiología no infecciosa, como la encefalitis mediada por anticuerpos contra el receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR).

La mecánica del diagnóstico diferencial mediante mNGS se fundamenta en el valor predictivo negativo (VPN) de la plataforma. Según detallan (Olie et al., 2024) y (Vanamala et al., 2025), la ausencia persistente de señales genómicas microbianas en una corrida de alta profundidad (superando los 10 millones de lecturas), en combinación con la detección de una firma transcripcional del hospedador indicativa de activación de células B o síntesis de autoanticuerpos, permite al clínico descartar la infección con una certidumbre técnica superior al 99%. Esta deplesión digital de la sospecha infecciosa es vital para el inicio temprano de terapias inmunosupresoras o plasmaféresis, intervenciones que serían deletéreas en presencia de un patógeno replicativo (Benoit et al., 2024).

Además, la bioinformática clínica aplicada a la diferenciación etiológica integra modelos de aprendizaje automático que evalúan el "paisaje epitranscriptómico" del LCR. Tal como postulan (D. Lu et al., 2025) y (Van Dijk et al., 2023), la identificación de modificaciones como la N6-metiladenosina (m^6A) en el ARN nativo del hospedador puede servir como un biomarcador de neuro-inflamación crónica autoinmune frente a la respuesta inmune innata aguda inducida por virus neurotrópicos. Esta capacidad de realizar un "fenotipado genómico" dual taxonomía microbiana negativa y firma transcriptómica positiva para autoinmunidad posiciona a la mNGS de nanoporos como el árbitro definitivo en la adjudicación diagnóstica de cuadros de encefalopatía idiopática (Benoit et al., 2024).

8.5.1. Impacto del volumen de muestra en la sensibilidad diagnóstica del LCR

La sensibilidad analítica de la metagenómica shotgun en el LCR está gobernada por la ley de los rendimientos decrecientes en muestras de baja biomasa microbiana. A diferencia de otros fluidos biológicos como el esputo o el pus de abscesos, el LCR es un medio con una celularidad fisiológica mínima y una concentración de ADN libre de células (cfDNA) extremadamente reducida. Como bien argumentan (Benoit et al., 2024) y (Agustinho et al., 2024), el volumen de muestra inicial procesado es el determinante biofísico principal de la cobertura genómica del patógeno.

La mecánica de la captura nucleotídica en LCR exige protocolos de extracción de "ultra-bajo aporte" (ultra-low input). Según el análisis crítico de (Nielsen et al., 2025) y (R. Wang et al., 2024), la obtención de al menos 1 a 2 mL de LCR es imperativa para garantizar una representación estocástica de los fragmentos sub-genómicos del patógeno. Un volumen insuficiente deriva en una "ventana de ceguera molecular" donde la señal microbiana se pierde en el ruido de fondo del ADN ambiental o del "kit-oma". Para compensar esta limitación, se emplean técnicas de lisis diferencial selectiva que degradan el rARN y el ADN humano dominante, incrementando la relación señal-ruido en varios órdenes de magnitud (Nielsen et al., 2025).

La relevancia clínica de la metrología del volumen se manifiesta en la detección de patógenos intracelulares o de replicación lenta, como *Mycobacterium tuberculosis* o *Cryptococcus neoformans*. (Milburn et al., 2024) y (Olie et al., 2024) señalan que en la meningitis tuberculosa, donde la carga bacilar puede ser inferior a un organismo por mililitro, la mNGS profunda con volúmenes optimizados permite identificar determinantes genéticos de resistencia a rifampicina (*rpoB*) que las pruebas de PCR rápida (GeneXpert Ultra) omiten debido a su dependencia de dianas de un solo locus. Por tanto, la optimización preanalítica del volumen de LCR no es un mero detalle técnico, sino un requisito biofísico para alcanzar la sensibilidad diagnóstica del 63.1% reportada por los centros de referencia de vanguardia, permitiendo la resolución de infecciones del SNC de origen crónico y baja densidad replicativa (Milburn et al., 2024).

8.5.2. Uso de la metagenómica en el diagnóstico post-mortem de patologías infecciosas

La aplicación de la mNGS en el ámbito de la patología forense y el diagnóstico post-mortem representa la culminación del "rescate microbiológico" en casos donde la vida del paciente se extinguió sin una resolución etiológica. En las unidades de cuidados intensivos,

hasta el 30% de los fallecimientos por cuadros febriles permanecen sin una adjudicación diagnóstica definitiva tras el examen anatomopatológico convencional (Terrones-Campos et al., 2026). La metagenómica post-mortem permite interrogar de manera omnisciente tanto los fluidos remanentes como los tejidos parenquimatosos fijados, actuando como una "biopsia genómica retrospectiva".

La biofísica de la mNGS post-mortem se apoya en la persistencia de las firmas genómicas incluso tras la degradación de la viabilidad celular. Tal como demuestran (Benoit et al., 2024), la secuenciación profunda de tejidos cerebrales o válvulas cardíacas post-mortem ha facilitado la identificación de virus emergentes neurotrópicos y bacterias fastidiosas, como *Coxiella burnetii*, que eluden el cultivo forense. El mecanismo de esta detección reside en la capacidad de los nanoporos para generar lecturas ultra-largas que atraviesan genomas bacterianos completos, permitiendo la reconstrucción de genomas ensamblados desde metagenomas (MAGs) que validan la presencia biológica inequívoca del agresor en el sitio del daño tisular (Agustinho et al., 2024).

Desde una perspectiva de salud pública, la mNGS post-mortem es una herramienta de vigilancia epidemiológica inestimable. Según analizan (Struelens et al., 2024) y (S. Casimiro-Soriguer et al., 2025), la resolución genómica de una muerte de etiología desconocida puede revelar el inicio de un brote clonal intrahospitalario o la introducción de un patógeno zoonótico en la comunidad. La integración de los datos de secuenciación con el análisis de la respuesta inmune molecular post-mortem proporciona una evidencia definitiva de causalidad, diferenciando la colonización cadavérica incidental de la patogenia invasiva que precipitó el fallo multiorgánico (Nielsen et al., 2025). En última instancia, esta "autopsia genómica" dota al sistema de salud de un cierre diagnóstico riguroso, permitiendo la implementación de medidas preventivas y ajustes en los protocolos de tratamiento empírico basados en la realidad microbiológica local (Benoit et al., 2024).

En conclusión, la neuro-metagenómica impulsada por la secuenciación de nanoporos representa una revolución en la ingeniería diagnóstica de las infecciones del SNC. Al resolver el dilema molecular entre autoinmunidad e infección, optimizar la sensibilidad mediante la metrología del volumen de LCR y habilitar el diagnóstico post-mortem de alta resolución, esta tecnología se posiciona como el nuevo estándar de oro para la medicina de precisión neurológica. El desafío futuro reside en la estandarización universal de los umbrales cuantitativos (GPM/RPM) y en la democratización del acceso a biosensores genómicos,

asegurando que cada fragmento de ácido nucleico se traduzca en una decisión clínica fundamentada en la integridad biológica total del paciente (Nielsen et al., 2025).

La arquitectura diagnóstica aplicada a las patologías del sistema nervioso central (SNC) ha experimentado una metamorfosis radical tras la integración de la secuenciación metagenómica shotgun de lectura larga (mNGS). Este avance no representa únicamente una mejora en la sensibilidad analítica, sino un cambio en la ontología del diagnóstico neuro-infeccioso, la transición de una búsqueda reactiva de patógenos predefinidos hacia una vigilancia molecular agnóstica de los santuarios biológicos. Como bien argumentan (Olie et al., 2024), el líquido cefalorraquídeo (LCR), al ser un fluido en contacto directo con el parénquima cerebral y las meninges, actúa como un reservorio de ácidos nucleicos que reflejan tanto la invasión biológica como la claudicación homeostática del tejido neural. En este contexto, la bioinformática clínica de nanoporos permite resolver crisis diagnósticas en cuadros de meningitis y encefalitis donde el estándar de oro tradicional el cultivo celular ha demostrado una obsolescencia biofísica insuperable (Milburn et al., 2024).

8.5.3. Detección de priones y variantes genéticas en enfermedades neurodegenerativas

La frontera diagnóstica de la neuro-metagenómica contemporánea se expande más allá de la taxonomía microbiana para adentrarse en la decodificación de las proteinopatías y las predisposiciones genómicas del hospedador. Las enfermedades por priones, como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, y trastornos neurodegenerativos como el Alzheimer, comparten con las infecciones crónicas un paisaje clínico de deterioro cognitivo y neuroinflamación pleomórfica, lo que a menudo genera una confusión diagnóstica de graves consecuencias terapéuticas. Según el análisis de (Coll et al., 2024) y (Haghighat et al., 2024), la utilidad de la mNGS en este ámbito no se limita a descartar etiologías infecciosas ("depleción digital de la sospecha"), sino que permite identificar biomarcadores estructurales y modificaciones epigenéticas en el ADN libre de células (cfDNA) del paciente.

La mecánica biofísica de esta detección en enfermedades neurodegenerativas se apoya en el análisis del paisaje de metilación y la identificación de variantes estructurales. Tal como postulan (Ratten et al., 2021) y (Van Dijk et al., 2023), la secuenciación de nanoporos es capaz de interrogar hebras de ADN nativo, preservando la información sobre la metilación de citocinas sin necesidad de conversión por bisulfito. Esta capacidad permite clasificar procesos neurodegenerativos mediante la firma epigenética de las neuronas en degeneración que vierten su material genético al LCR. Complementariamente, el uso de biosensores electroquímicos

integrados con algoritmos de aprendizaje profundo (Deep Learning) ha facilitado la cuantificación de la proteína de hilo neuronal asociada al Alzheimer (AD7c-NTP). Como bien analizan (Haghighat et al., 2024) y (Haghighat et al., 2024), la integración de estas señales proteómicas con el perfil metagenómico del paciente permite discernir si un cuadro de demencia rápidamente progresiva es el resultado de un proceso priónico primario o de una neuro-infección por patógenos de replicación lenta, como ciertos virus neurotrópicos o parásitos intracelulares (Haghighat et al., 2024). Esta convergencia multimodal es la que define la "neurología de precisión", donde el genoma del hospedador y el rastro biológico del agresor se interpretan como un ecosistema único (Coll et al., 2024).

8.6. Protocolos de urgencia para el diagnóstico de meningitis bacteriana decapitada

Uno de los dilemas analíticos más frustrantes en la medicina de emergencia es la denominada "meningitis decapitada", un estado donde la administración previa de antimicrobianos de amplio espectro frecuentemente cefalosporinas de tercera generación neutraliza la viabilidad celular bacteriana, resultando en cultivos de LCR persistentemente negativos. Fisiopatológicamente, aunque la bacteria ya no es capaz de replicarse *in vitro*, sus polímeros nucleotídicos persisten en el espacio subaracnoideo como fragmentos subgenómicos residuales. Los protocolos de urgencia basados en mNGS de nanoporos han sido diseñados específicamente para capturar esta señal efímera. Según detallan (Peri et al., 2024) y (Nielsen et al., 2025), el uso de la secuenciación de molécula única permite identificar el patógeno incluso horas o días después de que la terapia antibiótica haya comenzado, superando la "ventana de ceguera" de los métodos tradicionales (Nielsen et al., 2025).

La mecánica operativa de estos protocolos de urgencia exige una orquestación preanalítica de alta velocidad. Tal como analizan (Milburn et al., 2024) y (Agustinho et al., 2024), el flujo de trabajo comienza con una lisis mecánica vigorosa para liberar el ADN atrapado en los detritos inflamatorios, seguida de una deplesi3n selectiva de los ácidos nucleicos del hospedador mediante el uso de nucleasas como la Benzonase. Esta etapa es crítica porque, en la meningitis bacteriana, la respuesta inmune genera una pleocitosis masiva que puede eclipsar la señal del patógeno. La utilización de dispositivos portátiles como el MinION permite que la secuenciación y el *basecalling* ocurran de manera sincrónica. (Govender et al., 2025) demuestran que es posible alcanzar una identificaci3n etiológica con una confianza del 99% en menos de seis horas desde la punción lumbar. La relevancia clínica de esta celeridad es vital para el manejo de la meningitis por *Streptococcus pneumoniae* o *Neisseria meningitidis*, donde la detección oportuna de genes de resistencia, como las alteraciones en las

proteínas de unión a penicilina (PBP), permite ajustar el régimen terapéutico y minimizar las secuelas neurológicas permanentes (Nielsen et al., 2025).

8.7. Correlación entre pleocitosis y abundancia de lecturas genómicas

La interpretación doctoral de los informes metagenómicos en el SNC exige comprender la dinámica biofísica entre la celularidad del LCR y la tasa de recuperación de secuencias microbianas. La pleocitosis, definida clásicamente como un recuento de glóbulos blancos en LCR $\geq 1000/\text{mL}$, constituye el principal biomarcador de inflamación meníngea, pero actúa paradójicamente como una barrera técnica para la secuenciación profunda (Q. Zhang et al., 2023). Como bien señalan (Agustinho et al., 2024), existe una correlación inversa entre la densidad de leucocitos del hospedador y la profundidad de cobertura del genoma microbiano, a mayor cantidad de células inflamatorias humanas, mayor es el ruido genómico que los algoritmos deben filtrar, lo que incrementa el riesgo de omitir patógenos de baja biomasa.

Para resolver este conflicto metrológico, la bioinformática clínica utiliza el ratio de lecturas microbianas por millón (RPM) y la cuantificación absoluta mediante estándares internos ("spike-ins"). Según el análisis de (Nielsen et al., 2025) y (Coll et al., 2024), en casos de meningitis purulenta con pleocitosis extrema, el uso de protocolos de depleción de ADN humano ("Host Depletion") es imperativo para "despejar" el canal de secuenciación. Por el contrario, en pacientes inmunocomprometidos o con meningitis por patógenos intracelulares como *Listeria monocytogenes*, la ausencia de pleocitosis franca no descarta la infección; en estos escenarios, la detección de incluso tres lecturas únicas de una especie patogénica debe considerarse clínicamente significativa (Nielsen et al., 2025). La relevancia de monitorizar esta correlación radica en la capacidad de predecir la trayectoria del paciente. (J. Zhao et al., 2024) y (Nielsen et al., 2025) han observado que una baja pleocitosis combinada con una alta carga genómica microbiana (GPM) es un predictor potente de mortalidad precoz, reflejando un estado de "inmunoparálisis" donde el hospedador es incapaz de contener la replicación masiva del agresor, exigiendo una intervención terapéutica de máxima intensidad (Nielsen et al., 2025).

8.7.1. Controversias actuales, análisis crítico de la evidencia y perspectivas futuras

A pesar de la sofisticación de la neuro-metagenómica, su implementación sistémica enfrenta controversias epistemológicas y técnicas que condicionan su validación diagnóstica definitiva. La controversia más acuciante se centra en el fenómeno del "kit-oma" o contaminación ambiental. Como analizan (Albitar et al., 2023) y (Nielsen et al., 2025), la

extrema sensibilidad de los secuenciadores de nanoporos permite capturar señales de microorganismos residentes en los reactivos de laboratorio o en el aire de la sala de procesamiento. El análisis crítico de la evidencia sugiere que un resultado positivo por mNGS en LCR no es sinónimo de causalidad patogénica a menos que se apliquen umbrales de rigor biometrológico, como un ratio de RPM al menos diez veces superior al detectado en los controles negativos concomitantes (Nielsen et al., 2025).

Otra área de intenso debate es la opacidad algorítmica de la inteligencia artificial aplicada al diagnóstico neuro-infeccioso. (Goktas & Grzybowski, 2025) y (Kardjadj, 2025) advierten sobre el riesgo de las "cajas negras" en el llamado de variantes y la identificación taxonómica, donde el clínico recibe una adjudicación diagnóstica sin visibilidad sobre la métrica de confianza subyacente. Es imperativo transitar hacia una IA explicable (XAI) que proporcione una trazabilidad absoluta del proceso de inferencia, asegurando que la innovación computacional sea supervisada por el juicio doctoral (Goktas & Grzybowski, 2025). Además, el coste-efectividad de la mNGS sigue siendo cuestionado en entornos de recursos limitados. No obstante, como argumentan (Tian et al., 2026) y (Milburn et al., 2024), la reducción de las estancias prolongadas en la UCI debidas a diagnósticos erróneos o tardíos compensa con creces la inversión inicial en tecnología genómica.

Las perspectivas futuras se vislumbran en la convergencia de la metagenómica con la proteómica de nanoporos y la medicina personalizada. (Van Dijk et al., 2023) y (Haghighyegh et al., 2024) anticipan el desarrollo de biosensores portátiles "wearables" que realicen una monitorización continua de la carga microbiana y la respuesta inmune directamente en la piel o a través de biosensores mínimamente invasivos. Asimismo, la integración de marcos regulatorios globales, como el EU AI Act, proporcionará la gobernanza necesaria para asegurar que la información genómica de alta resolución se traduzca en una medicina de precisión equitativa, segura y científicamente irreprochable (Struelens et al., 2024).

En conclusión, la neuro-metagenómica representa la culminación de la integración tecnológica entre la biofísica de poros, la computación avanzada y la infectología clínica. Al resolver los enigmas de las meningitis decapitadas, monitorizar la dinámica entre pleocitosis y carga genómica y abordar críticamente los desafíos éticos de la IA, esta disciplina dota al clínico de una visión omnisciente. El desafío reside en la validación clínica universal y en la neutralización del ruido ambiental para garantizar que cada bit de información genómica sea un catalizador para la preservación de la vida y la integridad neurológica del paciente (Nielsen et al., 2025).

Capítulo IX

El Paciente Inmunocomprometido: Vigilancia en Trasplante y Onco-Hematología

La gestión clínica del paciente inmunocomprometido ya sea por neoplasias hematológicas, quimioterapia citotóxica o regímenes de supresión farmacológica tras un trasplante representa el escenario de mayor complejidad diagnóstica en la infectología contemporánea. En estos individuos, el "estado neto de inmunosupresión" dicta no solo la susceptibilidad a microorganismos convencionales, sino también la emergencia de patógenos oportunistas y la pérdida de la latencia viral (Martin-Loeches et al., 2025). Como bien analizan (Yin, s. f.) y (J. Zhao et al., 2024), el paradigma tradicional del cultivo microbiano resulta insuficiente debido a la biomasa marginal de los patógenos y al uso previo de profilaxis antimicrobiana, lo que exige una transición hacia una metrología molecular profunda basada en la secuenciación metagenómica shotgun de lectura larga (mNGS).

9.1. Monitoreo de la reactivación viral (CMV, EBV, BKV) mediante secuenciación cuantitativa

La reactivación de virus latentes constituye una de las principales causas de morbilidad y pérdida del injerto en el receptor de trasplante. Fisiopatológicamente, este evento es la consecuencia de una claudicación en la vigilancia efectora mediada por los linfocitos T citotóxicos CD8+, inducida tanto por el condicionamiento mieloablativo como por el uso de inhibidores de la calcineurina. Históricamente, el monitoreo de virus como el Citomegalovirus (CMV), el virus de Epstein-Barr (EBV) y el virus BK (BKV) se ha realizado mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) dirigida a dianas específicas. No obstante, como argumentan (Martin-Loeches et al., 2025) y (J. Zhao et al., 2025), la qPCR presenta limitaciones ante la emergencia de variantes con mutaciones en las regiones de unión de los cebadores y no permite detectar la reactivación simultánea de múltiples familias virales no previstas en el panel.

La mecánica de la secuenciación metagenómica cuantitativa aplicada al viroma plasmático permite superar estas restricciones mediante el interrogatorio agnóstico del ADN microbiano libre de células (ccfDNA). Según detallan (Nielsen et al., 2025) y (Hao et al., 2023), el uso de biosensores de nanoporos facilita la captura de fragmentos genómicos virales que circulan en el plasma como resultado de la lisis celular inducida por la replicación lítica. Al normalizar el conteo de lecturas virales mediante el uso de estándares internos de ADN de

cadena sencilla ("spike-ins"), la bioinformática clínica puede transformar abundancias relativas en concentraciones absolutas medidas en equivalentes genómicos por microlitro (GPM). Esta capacidad de metrología molecular es vital para discernir entre una "viremia de bajo nivel" transitoria y una reactivación patogénica progresiva que precede a la invasión de órganos diana, como la neumonitis por CMV o la nefropatía asociada a BKV (Nielsen et al., 2025).

La relevancia clínica de esta monitorización metagenómica reside en su capacidad para anticipar eventos de coinfección oportunista. (Yin, s. f.) demuestran que, en pacientes inmunocomprometidos con fiebre de origen desconocido, la mNGS de plasma permitió identificar coinfecciones virales complejas incluyendo reactivaciones concomitantes de CMV y virus del herpes humano 6 (HHV-6) que los paneles de PCR específicos omitieron. Además, la secuenciación de lectura larga facilita la detección de mutaciones estructurales en los genes *UL97* y *UL54*, responsables de la resistencia a ganciclovir y foscarnet, proporcionando un perfil de susceptibilidad genotípica en el mismo proceso diagnóstico (Yin, s. f.). Esta orquestación molecular dota al clínico de una "biopsia líquida del viroma" que permite ajustar de forma dinámica la intensidad de la inmunosupresión y la terapia antiviral preventiva antes de la manifestación de daño tisular irreversible (Struelens et al., 2024).

9.2. Identificación de patógenos oportunistas en el receptor de trasplante de órgano sólido

El receptor de trasplante de órgano sólido (SOT) atraviesa fases críticas de vulnerabilidad inmunológica donde el riesgo de infección evoluciona desde patógenos hospitalarios precoces hacia oportunistas tardíos como *Pneumocystis jirovecii*, micobacterias no tuberculosas y hongos filamentosos. La biofísica de estas infecciones a menudo implica un secuestro tisular que dificulta el diagnóstico mediante hemocultivos tradicionales. Según analizan (M. Zhao et al., 2024) y (Meng et al., 2025), la aplicación de la mNGS en muestras de lavado broncoalveolar (BALF) y fluidos de sitios estériles ha revolucionado la identificación etiológica en pacientes con trasplante pulmonar o renal que presentan cuadros respiratorios severos.

La mecánica analítica de la identificación de oportunistas se apoya en la optimización de los protocolos de lisis diferencial. Como exponen (Q. Zhang et al., 2023) y (Terrones-Campos et al., 2026), microorganismos con paredes celulares complejas, como los mohos invasores (*Aspergillus spp.*, Mucorales) y las micobacterias, exigen una homogeneización mecánica vigorosa con microesferas de circonio para liberar sus polímeros nucleotídicos. Una vez liberados, la secuenciación de lectura larga permite atravesar regiones genómicas altamente

repetitivas, facilitando una discriminación taxonómica exacta a nivel de especie que trasciende las capacidades de la PCR convencional. En el estudio multicéntrico de (W. Zhao et al., 2025), el uso de mNGS en pacientes inmunocomprometidos incrementó la tasa de detección de patógenos oportunistas en un 31% frente a los métodos convencionales, permitiendo la identificación de infecciones mixtas donde coexistían bacterias multirresistentes y hongos dimórficos raros (Meng et al., 2025).

La relevancia de este impacto se observa en la capacidad de realizar una desescalada o escalada terapéutica dirigida. (Yin, s. f.) subrayan que el diagnóstico metagenómico temprano facilitó el ajuste del tratamiento en el 41.5% de los pacientes SOT evaluados. Por ejemplo, la detección precoz de transcritos de *Pneumocystis jirovecii* en plasma mediante cfDNA metagenómico permitió iniciar el tratamiento con trimetoprima-sulfametoxazol semanas antes de que la carga fúngica fuera detectable en esputo o biopsia (Yin, s. f.). Asimismo, la integración de marcos de inteligencia artificial para filtrar el ADN ambiental y el "kit-oma" asegura que la detección de microorganismos de baja patogenicidad sea interpretada bajo un rigor doctoral que prevenga el sobretratamiento iatrogénico (Nielsen et al., 2025). En última instancia, la mNGS se consolida como la herramienta centinela definitiva para la preservación de la viabilidad del órgano trasplantado frente a la agresión biológica oportunista (Martin-Loeches et al., 2025).

9.3. Metagenómica en el trasplante de progenitores hematopoyéticos

El trasplante de progenitores hematopoyéticos (HSCT) representa la máxima expresión de la fragilidad biológica, donde la ablación medular y la posterior reconstitución inmune ocurren en paralelo a cambios drásticos en la arquitectura de la microbiota residente. La relación biofísica entre la diversidad del microbioma intestinal y la patogénesis de la enfermedad de injerto contra huésped (GvHD) ha emergido como un área de investigación crítica. Como bien analizan (Martin-Loeches et al., 2025) y (Alcock et al., 2023), la pérdida de diversidad microbiana específicamente la depleción de bacterias productoras de butirato de la familia *Lachnospiraceae* correlaciona con un incremento de la permeabilidad intestinal y la activación de señales proinflamatorias que exacerban la GvHD.

Tabla 10

Aplicaciones de la metagenómica en el trasplante de progenitores hematopoyéticos

Área de aplicación	Qué se analiza	Aporte de la metagenómica	Relevancia en el TPH
--------------------	----------------	---------------------------	----------------------

Detección de infecciones	ADN o ARN de bacterias, virus, hongos y otros microorganismos.	Permite investigar múltiples agentes simultáneamente.	Puede ampliar el diagnóstico cuando las pruebas convencionales no identifican el agente causal.
Infecciones oportunistas	Microorganismos asociados con inmunosupresión.	Facilita una búsqueda no limitada a un único patógeno.	Resulta relevante durante períodos de inmunosupresión intensa.
Reactivación viral	Material genético de virus potencialmente relevantes después del trasplante.	Permite monitorizar señales virales dentro de una estrategia molecular.	Puede complementar las pruebas dirigidas de vigilancia viral.
Microbiota intestinal	Composición y diversidad de microorganismos intestinales.	Permite caracterizar comunidades microbianas completas.	Ayuda a estudiar las modificaciones de la microbiota durante el tratamiento y recuperación.
Disbiosis	Alteraciones en la composición y equilibrio de la comunidad microbiana.	Permite identificar cambios en diversidad y abundancia relativa.	Puede relacionarse con complicaciones asociadas al trasplante y al tratamiento.
Resistencia antimicrobiana	Genes asociados con mecanismos de resistencia.	Permite detectar determinantes genéticos potencialmente relevantes.	Puede apoyar la vigilancia de resistencia en pacientes con alta exposición a antimicrobianos.
Carga microbiana	Cantidad relativa de secuencias asociadas con microorganismos.	La profundidad de lectura puede aportar información sobre abundancia.	Permite realizar seguimiento de cambios en el perfil microbiano, siempre con adecuada normalización.
Respuesta del huésped	Expresión de genes relacionados con inflamación e inmunidad.	Puede combinarse con análisis transcriptómica.	Permite estudiar conjuntamente microorganismo y respuesta inmunitaria.
Seguimiento longitudinal	Variaciones del microbioma y del perfil infeccioso a lo largo del tiempo.	Permite comparar muestras obtenidas en diferentes momentos.	Facilita la observación de cambios antes, durante y después de determinadas complicaciones.
Diagnóstico diferencial	Diferentes microorganismos potencialmente responsables de un cuadro clínico.	Permite realizar una búsqueda amplia en una sola plataforma.	Puede ser útil en cuadros complejos o de etiología incierta.
Nanopore	Secuencias largas generadas mediante lectura de moléculas individuales.	Ofrece análisis rápido y datos potencialmente disponibles en tiempo real.	Puede favorecer una respuesta diagnóstica más oportuna.
Integración clínica	Datos genómicos junto con síntomas, laboratorio e imágenes.	Convierte la información molecular en evidencia contextualizada.	Reduce el riesgo de interpretar de forma aislada una detección microbiana.

Nota: Elaboración propia a partir de (Govender et al., 2025),

La metagenómica tiene una importancia fundamental en el trasplante de células madre hematopoyéticas, dado que el paciente experimenta un cambio significativo en su microbioma y en su habilidad para combatir infecciones. Esto establece un escenario en el que una señal molecular puede ser interpretada de diversas maneras dependiendo de la fase clínica. Durante el procedimiento de trasplante, pueden presentarse modificaciones en la microbiota, la aparición de microorganismos que causan enfermedades, reactivaciones de virus y una exposición constante a medicamentos antimicrobianos.

Por esta razón, disponer de una herramienta capaz de analizar varios elementos microbianos simultáneamente puede enriquecer mucho el diagnóstico convencional. Además, la secuenciación Nanopore proporciona la ventaja de producir información rápidamente y de identificar secuencias largas. Por otro lado, el análisis bioinformático facilita la integración de la identificación taxonómica, la cantidad, la cobertura y los factores genéticos relacionados con la resistencia.

El verdadero valor clínico de esta información radica en su interpretación cuidadosa, ya que la detección de ADN o ARN microbiano no siempre refleja una infección activa; es clave diferenciarlo de la colonización, la contaminación o el material genético que queda de procesos previos. Por lo tanto, el método más efectivo es combinar el perfil metagenómico con la evolución clínica del paciente, los hallazgos microbiológicos, la respuesta del sistema inmunológico y otros biomarcadores, creando así una perspectiva continua del estado del paciente.

La implementación de la metagenómica shotgun de lectura larga en el HSCT permite una monitorización longitudinal y dinámica de este ecosistema. A diferencia de la secuenciación del gen 16S rARN, que proporciona una resolución taxonómica limitada, la mNGS de nanoporos facilita el mapeo funcional de las vías metabólicas de la microbiota. Tal como postulan (Agustinho et al., 2024) y (Van Dijk et al., 2023), la reconstrucción de genomas ensamblados desde metagenomas (MAGs) permite identificar no solo quiénes están presentes, sino qué genes de virulencia y resistencia antimicrobiana están portando las bacterias comensales antes de su potencial translocación sistémica. La detección de una dominancia de *Enterococcus faecium* multirresistente o de variantes hipervirulentas de *Klebsiella pneumoniae* en el reservorio fecal actúa como un predictor de riesgo de bacteriemia durante la fase de neutropenia profunda (Yin, s. f.).

Además, la metagenómica interviene en el diagnóstico diferencial de la fiebre post-trasplante. En pacientes HSCT, las manifestaciones clínicas de la GvHD intestinal y las

infecciones por virus entéricos o patógenos fúngicos son virtualmente indistinguibles. Según detallan (Yin, s. f.), la mNGS de plasma y heces permite resolver este dilema al identificar simultáneamente la presencia de patógenos virales raros y una firma transcripcional del hospedador indicativa de inflamación alogénica mediada por células T. La detección de marcadores de agotamiento celular leucocitario, como PD-1 o TIM-3, analizados por mNGS, proporciona una evidencia molecular del grado de inmunotolerancia o parálisis inmune, facilitando una intervención inmunomoduladora de precisión (Martin-Loeches et al., 2025). Esta orquestación molecular es la que permitirá que el HSCT transite hacia un modelo de gestión integral, donde el genotipo microbiano y el transcriptoma inmunológico del paciente guíen la prevención de las complicaciones letales del trasplante en el siglo XXI (Nielsen et al., 2025).

9.4. Controversias actuales, análisis crítico de la evidencia y perspectivas futuras

A pesar de la sofisticación técnica, la adopción sistémica de la metagenómica en el paciente inmunocomprometido enfrenta controversias que condicionan su aplicabilidad universal. El debate más intenso se centra en la interpretación de la "DNAemia basal" y el riesgo de sobrediagnóstico. Como analizan (Nielsen et al., 2025) y (Tian et al., 2026), la ubicuidad de fragmentos de ADN microbiano circulante en individuos con barreras mucosas dañadas frecuente tras la quimioterapia impone el reto de definir umbrales de positividad que distingan la translocación incidental de la infección invasiva. El análisis crítico de la evidencia sugiere que la significancia diagnóstica de la mNGS debe ser adjudicada integrando biomarcadores de severidad y la cuantificación absoluta en GPM, asegurando que la información genómica no derive en un uso inapropiado de antifúngicos de alto coste (Nielsen et al., 2025).

Otra controversia fundamental reside en la opacidad de los modelos de inteligencia artificial utilizados para el llamado de taxones y la predicción de resistencia. (Goktas & Grzybowski, 2025) y (Kardjadj, 2025) advierten que el clínico recibe a menudo resultados procesados por "cajas negras" algorítmicas sin visibilidad sobre las métricas de confianza subyacentes. Es imperativo transitar hacia una IA explicable (XAI) que proporcione una trazabilidad absoluta, permitiendo que el juicio doctoral valide la plausibilidad biológica de los hallazgos metagenómicos. Además, la estandarización de controles negativos para neutralizar el "kit-oma" es un requisito biofísico indispensable para garantizar la veracidad analítica en muestras de baja biomasa (Nielsen et al., 2025).

Las perspectivas futuras se vislumbran en la convergencia de la metagenómica con la proteómica de nanoporos y la medicina personalizada. (Van Dijk et al., 2023) y (Haghighat et al., 2024) anticipan el desarrollo de biosensores portátiles "wearables" que realicen una monitorización multimodal de la carga microbiana y la respuesta inmune directamente en la piel o fluidos intersticiales, permitiendo una vigilancia genómica ubicua y no invasiva. Asimismo, el uso de modelos de lenguaje de proteínas (PLM) permitirá identificar mecanismos de resistencia en patógenos oportunistas emergentes basándose en patrones estructurales conservados, superando los límites del alineamiento por homología (Manzoor et al., 2025). En última instancia, la integración de marcos regulatorios como el EU AI Act asegurará que la innovación biotecnológica se traduzca en una reducción sistémica de la mortalidad y una mejora en la calidad de vida de los pacientes inmunocomprometidos en la era de la medicina genómica (Struelens et al., 2024).

En conclusión, la vigilancia genómica en el trasplante y onco-hematología representa la culminación de la integración tecnológica entre la biofísica de poros, la computación avanzada y la infectología de precisión. Al resolver la cinética de la reactivación viral, habilitar la detección de oportunistas elusivos y mapear la dinámica de la microbiota en el HSCT, esta tecnología dota al clínico de una visión omnisciente. El desafío reside en la validación clínica universal y en la neutralización del ruido biológico para garantizar que cada bit de información genómica sea un catalizador para la preservación de la vida y la integridad del injerto en el paciente crítico (Nielsen et al., 2025).

La gestión clínica del paciente inmunocomprometido ya sea por la instauración de regímenes de quimioterapia mieloablativa, la terapia con células CAR-T o el estado de inmunosupresión farmacológica tras el trasplante de órgano sólido (SOT) o de progenitores hematopoyéticos (HSCT) representa el desafío más complejo de la infectología contemporánea. En este escenario, el equilibrio entre la prevención de la agresión microbiana y la mitigación de la toxicidad inmunológica es sumamente frágil. Como bien postulan (Martin-Loeches et al., 2025), el concepto de "estado neto de inmunosupresión" debe ser reevaluado bajo una óptica molecular, integrando la cinética de la reconstitución inmune con la monitorización agnóstica de patógenos oportunistas que, bajo el amparo de la claudicación homeostática del hospedador, emergen con virulencia inusitada (Martin-Loeches et al., 2025).

9.5.Detección temprana de infecciones fúngicas invasivas (Aspergilosis/Mucormicosis)

La arquitectura diagnóstica de las infecciones fúngicas invasivas (IFI), predominantemente la aspergilosis pulmonar invasiva (IPA) y la mucormicosis, ha experimentado una transición desde la morfología descriptiva hacia la resolución genómica profunda. Fisiopatológicamente, la invasión fúngica en el paciente crítico no neutropénico está orquestada por el uso prolongado de corticosteroides, los cuales, al suprimir la señalización del complejo NF- κ B y regular a la baja la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), inducen un perfil inmunológico Th2 sesgado que inhabilita la depuración de conidias. Según el análisis exhaustivo de (Terrones-Campos et al., 2026), esta parálisis inmunitaria permite que el hongo transite desde la colonización saprófita hacia la angioinvasión sistémica, a menudo precediendo a las manifestaciones radiológicas clásicas como el "signo del halo", que son virtualmente inexistentes en poblaciones no neutropénicas (Terrones-Campos et al., 2026).

La biofísica de la detección metagenómica de hongos impone desafíos técnicos sustanciales debido a la integridad estructural de la pared celular fúngica, compuesta por polímeros densos de quitina y glucanos. Para solventar esta barrera, la bioinformática clínica de nanoporos se apoya en protocolos de lisis mecánica optimizados, como el protocolo C002 descrito por (Q. Zhang et al., 2023), que emplea homogeneización vigorosa con microesferas de circonio para liberar el material nucleotídico secuestrado. Esta aproximación permite que la secuenciación de lectura larga interroge directamente el ADN microbiano libre de células (ccfDNA) en plasma. Como bien argumentan (Nielsen et al., 2025) y (Yin, s. f.), la detección de señales genómicas fúngicas en sangre mediante mNGS ha demostrado una sensibilidad diagnóstica superior al galactomanano y al (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucano, permitiendo identificar especies de *Aspergillus* no-fumigatus y Mucorales en etapas preclínicas. La relevancia de esta celeridad es vital, la instauración de una terapia antifúngica dirigida con isavuconazol o anfotericina B liposomal basada en la carga genómica absoluta (GPM) reduce la mortalidad sistémica al minimizar el daño tisular irreversible y evitar el inicio tardío del tratamiento en pacientes donde el cultivo tradicional presenta una latencia diagnóstica inaceptable (Q. Zhang et al., 2023).

9.5.1. Dinámica del microbioma intestinal como predictor de complicaciones infecciosas

El reservorio entérico bacteriano actúa como el epicentro de la patogenia infecciosa en el paciente inmunocomprometido, donde la pérdida de la integridad de la mucosa y la reducción de la diversidad taxonómica preceden a los eventos de translocación sistémica. La biofísica de

esta dinámica intestinal está marcada por el agotamiento de bacterias productoras de butirato, como los géneros pertenecientes a la familia *Lachnospiraceae*, lo que deriva en un estado proinflamatorio que exacerba el riesgo de enfermedad de injerto contra huésped (GvHD) tras un trasplante de progenitores. Tal como analizan (Martin-Loeches et al., 2025), la monitorización longitudinal de la microbiota mediante secuenciación agnóstica permite identificar la dominancia de pathobiontes como *Enterococcus faecium* multirresistente o clones hipervirulentos de *Klebsiella pneumoniae* antes de que estos se manifiesten como agentes etiológicos de bacteriemias recurrentes (Maugeri et al., 2025).

La implementación de la metagenómica shotgun en muestras fecales facilita la reconstrucción de genomas ensamblados desde metagenomas (MAGs), permitiendo el mapeo de plásmidos de resistencia que circulan de manera silente en el microbioma residente. Como ilustran (Maugeri et al., 2025) en su estudio sobre colonización y diseminación, la coincidencia exacta de los replicantes plasmáticos entre los aislados rectales y los hemocultivos positivos confirma que la microbiota intestinal es la biblioteca genética de la cual los patógenos invasores extraen sus determinantes de resistencia bajo presión antibiótica. Esta capacidad predictiva molecular dota al clínico de una herramienta de vigilancia epidemiológica personalizada, permitiendo ajustar los protocolos de descolonización selectiva o profilaxis dirigida en función de la arquitectura genómica del resistoma intestinal, anticipando así el fallo terapéutico en fases de neutropenia profunda (Struelens et al., 2024).

9.5.2. Impacto de la neutropenia febril en la composición del metagenoma sanguíneo

La neutropenia febril constituye la emergencia onco-hematológica por excelencia, caracterizada por una "ceguera microbiológica" donde hasta el 60% de los episodios febriles carecen de confirmación etiológica por métodos de cultivo convencionales. La biofísica de la sangre en el paciente neutropénico revela un paisaje metagenómico único, la reducción drástica de la celularidad del hospedador facilita paradójicamente una mayor recuperación de fragmentos genómicos microbianos, incrementando la sensibilidad analítica de la secuenciación de nanoporos. Según el estudio prospectivo de (Yin, s. f.), la aplicación de plasma mNGS en pacientes con neutropenia febril permitió una tasa de positividad del 65.2%, identificando un espectro polimicrobiano de virus, bacterias fastidiosas y hongos que las pruebas de cultivo y PCR específicas omitieron de manera sistemática (Yin, s. f.).

La mecánica de esta detección se fundamenta en la captura del ADN microbiano libre de células circulante, el cual actúa como un rastro biológico de la invasión tisular. (Nielsen

et al., 2025) y (Govender et al., 2025) destacan que la mNGS de lectura larga permite resolver casos de sepsis por patógenos de baja biomasa, como *Capnocytophaga canimorsus* o bacterias anaerobias, cuya viabilidad celular se ve comprometida por la profilaxis antimicrobiana previa. La metrología de esta "biopsia líquida" infecciosa exige la cuantificación absoluta mediante estándares internos, permitiendo al médico discernir si la señal detectada es un reflejo de una translocación basal o una bacteriemia invasiva verdadera. Al integrar estos datos con biomarcadores de severidad como el score SOFA, el clínico puede realizar una desescalada o escalada antibiótica dirigida en un intervalo de 6 a 24 horas, optimizando la gestión de los antimicrobianos de último recurso y reduciendo las complicaciones multiorgánicas asociadas a la exposición prolongada a fármacos nefrotóxicos en esta población vulnerable (Nielsen et al., 2025).

9.5.3. Evaluación de la inmunidad viral mediante perfiles de expresión de interferón

La culminación de la vigilancia en el paciente trasplantado reside en la resolución simultánea de la carga viral y el estado de inmunidad efectora del hospedador. La reactivación de virus latentes, específicamente Citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV) y virus BK, es el resultado directo de una claudicación en la vigilancia mediada por linfocitos T. No obstante, la cuantificación de la viremia por qPCR a menudo es insuficiente para predecir el daño orgánico. La bioinformática clínica propone el uso de la transcriptómica del hospedador para interrogar la activación de redes de co-expresión génica vinculadas a la respuesta de interferón tipo I y II. Como bien exponen (D. Lu et al., 2025), el sistema TriVerity facilita la evaluación de firmas de 29 mARN inmunológicos que reflejan el estado de activación celular leucocitaria en tiempo real (D. Lu et al., 2025).

El mecanismo biofísico de este fenotipado inmunológico permite distinguir entre una reactivación viral benigna y una infección invasiva con respuesta inflamatoria deletérea. Según analizan (Martin-Loeches et al., 2025), la detección de marcadores de agotamiento de células T, como PD-1, TIM-3 o LAG-3, analizados mediante secuenciación de ARN nativo, proporciona una métrica de alta resolución sobre el grado de "inmunoparálisis" del paciente. Una firma transcriptómica dominada por señales de interferón gamma en presencia de una viremia ascendente por CMV actúa como un centinela de neumonitis inminente, exigiendo una intervención antiviral agresiva y un ajuste preventivo de la inmunosupresión. Esta orquestación molecular es la que permite que el manejo del paciente inmunocomprometido evolucione de un modelo reactivo basado en síntomas hacia una medicina de precisión donde el perfil de expresión génica del paciente dicta la intensidad de la terapia inmunomodulador y antiviral,

garantizando la preservación del injerto y la supervivencia del paciente en la era genómica (Nielsen et al., 2025).

En conclusión, la vigilancia genómica y transcriptómica en el paciente inmunocomprometido representa el cenit de la integración tecnológica en la infectología onco-hematológica. Al habilitar la detección precoz de IFIs, mapear la dinámica de translocación del microbioma intestinal, resolver la complejidad etiológica de la neutropenia febril y decodificar la inmunidad viral mediante firmas de interferón, esta disciplina dota al clínico de una inteligencia biológica absoluta. El desafío futuro reside en la validación universal de estos modelos predictivos y en la democratización del acceso a biosensores de nanoporos para que la información molecular de alta resolución se traduzca en una mejora sistémica de los desenlaces clínicos en la primera línea de la medicina de trasplantes (Nielsen et al., 2025).

La vulnerabilidad biológica intrínseca de los pacientes onco-hematológicos y receptores de trasplantes exige una redefinición de los protocolos de monitorización infecciosa, migrando desde la observación sintomática reactiva hacia una vigilancia molecular proactiva. El "estado neto de inmunosupresión", un equilibrio dinámico entre la patología de base y la iatrogenia farmacológica, determina una susceptibilidad única a patógenos que, en hospederos competentes, carecen de relevancia clínica (Martin-Loeches et al., 2025). Como bien argumentan (Yin, s. f.) y (Y. Zhao et al., 2024), la integración de la secuenciación metagenómica shotgun (mNGS) permite resolver la latencia diagnóstica impuesta por los métodos de cultivo, facilitando una intervención terapéutica que actúe en las fases pre-clínicas de la invasión tisular.

9.6. Vigilancia de brotes nosocomiales en unidades de oncología mediante filogenética

La contención de la transmisión intrahospitalaria de patógenos multirresistentes (MDR) en unidades de cuidados intensivos oncológicos representa uno de los pilares de la seguridad del paciente. Históricamente, la epidemiología hospitalaria se ha basado en técnicas de tipificación de baja resolución, como la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) o el tipificado de secuencias multilocus (MLST), las cuales a menudo fallan al distinguir entre linajes bacterianos estrechamente relacionados. En este contexto, la vigilancia genómica en tiempo real emerge como una herramienta disruptiva. Tal como analizan (Struelens et al., 2024) y (S. Casimiro-Soriguer et al., 2025), el uso de secuenciación de genoma completo (WGS) permite una reconstrucción filogenética de alta resolución, facilitando la identificación inequívoca de cadenas de transmisión y eventos de transferencia horizontal de genes (HGT).

La mecánica biofísica de esta vigilancia se apoya en la resolución de variantes de nucleótido único (SNPs). Según detallan (Coll et al., 2024), la detección de un número marginal de SNPs entre dos aislados de *Klebsiella pneumoniae* o *Acinetobacter baumannii* proporciona una evidencia definitiva de un ancestro común reciente, validando la existencia de un brote nosocomial en lugar de introducciones esporádicas e independientes. Esta capacidad es vital en entornos oncológicos donde microorganismos como las enterobacterias productoras de carbapenemasas (CPE) pueden colonizar silenciosamente a los pacientes. Como demuestran (Maugeri et al., 2025) en su estudio sobre colonización y diseminación, el uso de la secuenciación por nanoporos permite incluso monitorizar la dinámica de plásmidos de resistencia como aquellos que portan los genes *blaKPC* o *blaNDM* que circulan entre diferentes especies bacterianas dentro de una misma unidad, un fenómeno invisible para los métodos diagnósticos convencionales (Struelens et al., 2024).

La relevancia clínica de la filogenómica en oncología reside en su impacto sobre la mortalidad y la gestión de recursos. (Tian et al., 2026) y (Struelens et al., 2024) subrayan que la identificación temprana de un brote clonal permite la implementación inmediata de medidas de aislamiento y descolonización selectiva, evitando el cierre de salas enteras y reduciendo los costes catastróficos asociados a las infecciones asociadas a la asistencia sanitaria (IAAS). Además, la integración de metadatos contextuales mediante especificaciones como PHA4GE asegura que la información genómica sea interpretable por los directores de epidemiología para orquestar una respuesta de salud pública coordinada y basada en la evidencia biometrológica de alta fidelidad (Struelens et al., 2024).

9.7. Personalización de la profilaxis antimicrobiana basada en el resistoma basal

El paradigma de la profilaxis antibiótica y antifúngica universal en el paciente neutropénico está siendo cuestionado por la emergencia de la medicina de precisión genómica. La administración indiscriminada de fluoroquinolonas o azoles no solo altera la arquitectura de la microbiota comensal, sino que ejerce una presión selectiva que favorece la expansión de reservorios de genes de resistencia. La bioinformática clínica contemporánea propone el uso del mapeo del resistoma intestinal para guiar la selección del régimen profiláctico. Como bien exponen (Alcock et al., 2023) y (Manzoor et al., 2025), el uso de la Antibiotic Resistance Ontology (ARO) y herramientas como RGI facilitan la identificación de determinantes de resistencia "ocultos" en el metagenoma fecal del paciente antes del inicio de la quimioterapia.

La mecánica de esta personalización se fundamenta en la capacidad predictiva del resistoma basal sobre el riesgo de bacteriemia futura. Según analizan (Maugeri et al., 2025), existe una correlación biológica entre la presencia de genes de resistencia específicos en la microbiota intestinal y la etiología de los episodios febriles posteriores. Al detectar una dominancia de pathobiontes portadores de bombas de eflujo sobre expresadas o mutaciones en porinas (como *OmpK36* en *K. pneumoniae*), el clínico puede desestimar la profilaxis estándar y optar por una monitorización intensiva o una intervención dirigida. Esta transición hacia un "fenotipo genómico predictivo" permite minimizar la toxicidad sistémica y preservar la diversidad taxonómica de la microbiota, un factor que (Martin-Loeches et al., 2025) identifican como un protector crítico frente a la enfermedad de injerto contra huésped (GvHD) en el trasplante de progenitores (Alcock et al., 2023).

Además, el uso de modelos de aprendizaje automático (ML) entrenados con bases de datos como CARD permite predecir la Concentración Inhibitoria Mínima (CMI) *in silico* de los microorganismos colonizantes. Tal como postulan (Manzoor et al., 2025) y (Bakir et al., 2025), esta metrología molecular permite ajustar las dosis profilácticas para superar umbrales de resistencia de bajo nivel, optimizando la eficacia del fármaco y reduciendo el riesgo de fallo terapéutico. En última instancia, la mNGS de lectura larga, al resolver la estructura completa de los elementos genéticos móviles (MGEs) que flanquean a los genes de resistencia, proporciona una inteligencia biológica superior sobre el potencial de diseminación sistémica, permitiendo que la profilaxis evolucione de un protocolo de "talla única" hacia una gestión de riesgos individualizada y dinámicamente ajustada (Manzoor et al., 2025).

9.7.1. Detección de *Pneumocystis jirovecii* y coinfecciones en pacientes con VIH

La neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (PCP) continúa siendo una complicación definitoria de SIDA con alta mortalidad, caracterizada por la imposibilidad de cultivo del patógeno y una baja sensibilidad de la microscopía convencional. En este escenario, la mNGS de lectura larga ha demostrado ser una herramienta diagnóstica superior. Como bien analizan (R. Wang et al., 2024) y (Baek et al., 2021), la secuenciación metagenómica shotgun en muestras de lavado broncoalveolar (BALF) presenta una sensibilidad superior al 95% para la identificación de *P. jirovecii*, superando incluso a la PCR cuantitativa específica al capturar lecturas de múltiples loci genómicos simultáneamente.

La biofísica de esta detección en el paciente con VIH exige considerar el paisaje polimicrobiano. Es infrecuente que la PCP se presente de manera aislada; por el contrario, la

mNGS facilita la identificación de coinfecciones virales y bacterianas que los métodos tradicionales omiten. Según detallan (Yin, s. f.) y (Feijoó et al., s. f.), el uso de biosensores de nanoporos permite detectar la reactivación concomitante de virus oportunistas como el Citomegalovirus (CMV), el virus de Epstein-Barr (EBV) o virus de la familia *Herpesviridae* (como HHV-6), los cuales actúan como cofactores en la progresión del daño pulmonar. La captura de ácidos nucleicos de micobacterias no tuberculosas y hongos dimórficos raras en la misma corrida de secuenciación dota al clínico de una visión omnisciente de la patogenia respiratoria, facilitando un régimen antimicrobiano multimodal que aborde todos los componentes del ecosistema infeccioso (Yin, s. f.).

La relevancia clínica de este abordaje metagenómico reside en la capacidad de estratificar el riesgo mediante la cuantificación absoluta. (Nielsen et al., 2025) y (Milburn et al., 2024) subrayan la importancia de utilizar estándares internos ("spike-ins") para medir la carga microbiana en equivalentes genómicos por microlitro (GPM). Esta metrología es fundamental para distinguir entre la colonización pulmonar de bajo nivel por *P. jirovecii* y una neumonía invasiva activa que requiera altas dosis de trimetoprima-sulfametoxazol y corticosteroides. Además, la mNGS de lectura larga permite detectar mutaciones estructurales en el gen de la dihidropteroato sintasa (*DHPS*), determinantes de la resistencia a las sulfas, proporcionando información pronóstica crítica sobre la trayectoria del paciente antes de la manifestación de hipoxemia refractaria (Nielsen et al., 2025).

9.7.2. Controversias actuales, análisis crítico de la evidencia y perspectivas futuras

A pesar del refinamiento tecnológico de la secuenciación de nanoporos, su adopción sistémica enfrenta dilemas epistemológicos que condicionan su aplicabilidad universal. El debate más intenso se centra en el fenómeno del "kit-oma" y la contaminación ambiental. Como analizan (Albitar et al., 2023) y (Nielsen et al., 2025), la sensibilidad extrema a nivel de molécula única puede capturar señales genómicas residentes en los reactivos de laboratorio, induciendo falsos diagnósticos en muestras de baja biomasa microbiana. El análisis crítico de la evidencia sugiere que un resultado positivo por mNGS debe ser validado mediante umbrales de rigor biometrológico, como un ratio de lecturas por millón (RPM) diez veces superior al control negativo, asegurando que la detección sea un reflejo de una invasión biológica verdadera y no un artefacto técnico (Nielsen et al., 2025).

Otra controversia fundamental reside en la interpretabilidad de los modelos de inteligencia artificial utilizados para el diagnóstico y la predicción de resistencia. (Goktas &

Grzybowski, 2025) y (Kardjadj, 2025) advierten sobre el riesgo de las "cajas negras" algorítmicas, donde las decisiones terapéuticas se basan en puntuaciones de confianza cuya lógica interna es opaca para el facultativo. Es imperativo transitar hacia una IA explicable (XAI) que proporcione una trazabilidad absoluta del proceso de inferencia y que esté validada en ensayos clínicos aleatorizados multicéntricos. La evidencia actual, aunque robusta en términos de sensibilidad diagnóstica, todavía requiere estudios de impacto de gran escala que demuestren una reducción inequívoca de la mortalidad por todas las causas en pacientes oncológicos críticamente enfermos (Struelens et al., 2024).

Las perspectivas futuras se vislumbran en la convergencia de la metagenómica con la proteómica de nanoporos y los biosensores "wearables". (Van Dijk et al., 2023) y (Haghighy et al., 2024) anticipan el desarrollo de dispositivos portátiles integrados sobre chips CMOS que realicen una monitorización continua de la carga genómica microbiana y la respuesta inmune del paciente directamente en el fluido intersticial. Asimismo, el uso de modelos de lenguaje de proteínas (PLM) permitirá identificar mecanismos de resistencia emergentes basándose en patrones estructurales conservados, superando las limitaciones del alineamiento por homología convencional (Manzoor et al., 2025). En última instancia, la estandarización de marcos regulatorios globales, como el EU AI Act, asegurará que la innovación biotecnológica se traduzca en una medicina de precisión equitativa, segura y científicamente irreprochable para el manejo del paciente inmunocomprometido en el siglo XXI (Struelens et al., 2024).

En conclusión, la vigilancia genómica en el trasplante y onco-hematología representa la culminación de la integración tecnológica entre la biofísica de poros, la computación avanzada y la infectología de precisión. Al resolver la epidemiología de los brotes nosocomiales, personalizar la profilaxis basada en el resistoma y habilitar la detección exhaustiva de coinfecciones en pacientes con VIH, esta disciplina dota al clínico de una inteligencia biológica total. El desafío reside en la validación clínica universal y en la neutralización del ruido biológico para garantizar que cada bit de información genómica se traduzca en una preservación de la vida y la integridad del injerto en el paciente crítico (Nielsen et al., 2025).

La transición hacia una medicina de precisión en el manejo de las enfermedades infecciosas críticas demanda una reestructuración profunda de las unidades de cuidados intensivos y los laboratorios de microbiología. Como bien postulan (Kurnat-Thoma, 2024), la sinergia entre el *diagnostic stewardship* (gestión diagnóstica) y el *antimicrobial stewardship* (PROA) constituye el eje gravitacional sobre el cual orbita la reducción de la morbi-mortalidad

asociada a la sepsis. En esta nueva era, denominada PROA 2.0, la secuenciación metagenómica shotgun de nanoporos (mNGS) no se percibe simplemente como una adición tecnológica, sino como el motor biometrológico que permite disolver la latencia diagnóstica impuesta por el cultivo convencional (Nielsen et al., 2025).

Capítulo X

Integración de la Metagenómica en los Programas de Optimización de Antimicrobianos (PROA)

La metamorfosis del microbiólogo clínico, de un analista centrado en la observación de la morfología celular y el crecimiento en medios sintéticos a un consultor de alta complejidad en datos genómicos, representa un cambio ontológico en la medicina hospitalaria. Históricamente, el rol del microbiólogo se limitaba a la validación cualitativa del crecimiento microbiano; sin embargo, en el paradigma actual, este profesional debe actuar como el traductor de la complejidad bioinformática hacia el pie de cama del paciente crítico. Como analizan (Alcock et al., 2023) y (Struelens et al., 2024), este nuevo rol exige el dominio de la Antibiotic Resistance Ontology (ARO), un marco jerárquico que permite normalizar los hallazgos metagenómicos y transformarlos en perfiles de resistencia predictivos que el clínico pueda interpretar de manera unívoca (Struelens et al., 2024).

La mecánica de esta consultoría genómica se apoya en el uso de plataformas como el Resistance Gene Identifier (RGI) y el Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD). Según detallan (Alcock et al., 2023) y (Govender et al., 2025), el consultor de datos genómicos debe ser capaz de discernir entre hits de alineamiento "perfectos" o "estrictos" frente a los "nudged", los cuales aumentan la sensibilidad de detección en muestras de baja biomasa, como la sangre o el líquido cefalorraquídeo, pero requieren una validación experta para evitar el sobrediagnóstico. La relevancia clínica de esta función es inmediata, el microbiólogo ya no entrega un informe estático, sino un archivo dinámico de resistoma donde la detección de mecanismos de eflujo, como el sistema AcrAB-TolC, o mutaciones en porinas de membrana externa, es contextualizada dentro de la probabilidad de éxito de la terapia dirigida (Govender et al., 2025).

Además, como argumentan (Hao et al., 2023) y (Pinzauti et al., 2025), el microbiólogo-consultor integra la vigilancia genómica en tiempo real con la epidemiología local del hospital. Mediante la monitorización longitudinal de variantes estructurales y elementos genéticos móviles (MGEs) detectados por secuenciación de lectura larga, este profesional puede identificar la circulación de plásmidos de carbapenemasas como los portadores de *bla*NDM-1 entre diferentes especies bacterianas dentro de una misma unidad de cuidados intensivos. Esta orquestación molecular es la que permite que el PROA 2.0 trascienda el control reactivo del uso de antibióticos para consolidarse como un sistema de inteligencia biológica que anticipa el

fallo terapéutico y la diseminación de clones hipervirulentos antes de que el cultivo tradicional proporcione una señal positiva (Struelens et al., 2024).

10.1. Algoritmos de decisión para la transición de terapia empírica a dirigida

La optimización de la transición desde una antibioticoterapia empírica de amplio espectro hacia un régimen dirigido constituye el principal desafío biológico y logístico en el manejo de la sepsis grave. Como bien exponen (Pinzauti et al., 2025) y (Govender et al., 2025), el uso de flujos de trabajo asistidos por NGS, como el protocolo PISTE, ha demostrado niveles de concordancia diagnóstica superiores al 90% para los principales patógenos de la sepsis en comparación con el estándar de oro del cultivo. La mecánica biofísica de esta transición se fundamenta en el acortamiento drástico del *Time-to-Result* (TTR); mientras que el cultivo convencional impone una espera de 48 a 72 horas para un perfil de susceptibilidad completo, la mNGS de nanoporos proporciona la identidad taxonómica y el resistoma funcional en un intervalo de 3 a 6 horas tras la recolección de la muestra (Govender et al., 2025).

La implementación de algoritmos de decisión basados en metagenómica directa de fluidos estériles permite una reingeniería de la reanimación infecciosa. Tal como analizan (Nielsen et al., 2025) y (Adusumalli, 2022), el algoritmo comienza con la cuantificación absoluta de la carga microbiana mediante genome-equivalentes por microlitro (GPM). Un umbral ≥ 10 RPM (lecturas por millón) en presencia de una firma genotípica de carbapenemasa como *blaKPC* o *blaOXA-48* activa una alerta inmediata para la escalada terapéutica hacia regímenes de último recurso como ceftazidima-avibactam. Por el contrario, la ausencia de genes de resistencia determinantes en una muestra con cobertura genómica representativa faculta al intensivista para realizar una desescalada segura, retirando antibióticos innecesarios y mitigando el daño colateral sobre la microbiota residente (Nielsen et al., 2025).

La relevancia clínica de estos algoritmos es particularmente notable en pacientes con cultivos negativos que, no obstante, presentan una claudicación orgánica manifiesta evaluada por el score SOFA. (Liborio et al., 2024) subrayan que hasta un 40% de los pacientes en la UCI reciben antimicrobianos sin confirmación microbiológica. El algoritmo de decisión molecular rompe este punto ciego al capturar fragmentos de ADN microbiano libre de células (ccfDNA) que circulan tras la neutralización bacteriana por antibióticos previos o por la respuesta inmunitaria innata. Al integrar la metrología del patógeno con biomarcadores del hospedador como las firmas de expresión génica de 29 mRNA del panel TriVerity, el clínico puede discernir con una especificidad del 95% si la persistencia de la inflamación sistémica es de

origen infeccioso o si constituye una respuesta inflamatoria estéril post-insulto, optimizando así el uso de recursos y reduciendo la estancia hospitalaria inefectiva (Nielsen et al., 2025).

10.2. Reducción del uso de antibióticos de amplio espectro mediante diagnóstico rápido del resistoma

La contención de la presión selectiva ejercida por los carbapenémicos y las cefalosporinas de última generación es un imperativo ético y biológico para preservar la eficacia de los antimicrobianos. El diagnóstico rápido del resistoma mediante mNGS profunda actúa como el principal agente des-presurizador en la UCI. Como señalan (Meng et al., 2025) y (Yin, s. f.), la identificación temprana de la ausencia de mecanismos de resistencia permite el ajuste del tratamiento en el 41.5% de los casos en pacientes inmunocomprometidos, facilitando una desescalada dirigida hacia agentes de espectro reducido en las primeras 24 horas del episodio febril (Yin, s. f.).

La mecánica de esta reducción del consumo antibiótico se apoya en la precisión predictiva de la CMI *in silico*. Según el análisis doctoral de (Hao et al., 2023) y (Alcock et al., 2023), la integración de modelos de aprendizaje automático entrenados con vastos conjuntos de datos genotipo-fenotipo permite no solo identificar el gen de resistencia, sino predecir el nivel de susceptibilidad real del microorganismo. Esta capacidad de realizar un "antibiograma genómico" en tiempo real desplaza el dogma del tratamiento empírico masivo. La relevancia clínica es inmediata, la detección precoz de la sensibilidad a la piperacilina-tazobactam en una sepsis por *Pseudomonas aeruginosa* detectada a 94 GPM permite evitar el uso prolongado de meropenem, reduciendo la incidencia de fallo renal agudo iatrogénico y previniendo la emergencia de infecciones secundarias por mohos oportunistas cuya invasión es favorecida por la parálisis inmunitaria inducida por el sobre-tratamiento (Nielsen et al., 2025).

Desde la perspectiva de la gestión económica sistémica, la inversión en metagenómica shotgun se compensa mediante la reducción de las estancias hospitalarias prolongadas. (Tian et al., 2026) y (Q. Zhang et al., 2023) demuestran que el ahorro generado por evitar menos de 48 horas de hospitalización inefectiva en la UCI absorbe completamente el coste de la secuenciación de nanoporos. En última instancia, la integración de la mNGS en los programas PROA 2.0 no debe evaluarse solo bajo la métrica del coste por test, sino como una herramienta de alto valor clínico que maximiza la certidumbre diagnóstica inicial. Esta transición hacia una metrología genómica ubicua garantiza que la administración de antimicrobianos sea dictada por la realidad biológica de la infección y no por la latencia del laboratorio tradicional,

consolidando a la metagenómica como la piedra angular de la seguridad del paciente y la sostenibilidad de los sistemas de salud modernos (Nielsen et al., 2025).

En conclusión, la integración de la metagenómica en los programas PROA representa la culminación de la reingeniería clínica de la infectología del siglo XXI. Al empoderar al microbiólogo como consultor de datos genómicos, instaurar algoritmos de decisión basados en la metrología molecular y reducir sistémicamente la dependencia de los antibióticos de amplio espectro, esta disciplina dota al intensivista de una inteligencia biológica total. El desafío inmediato reside en la democratización del acceso a estos biosensores y en la validación universal de los umbrales de significancia clínica, asegurando que cada bit de información genómica se traduzca en una vida salvada en la primera línea de los cuidados críticos (Nielsen et al., 2025).

La evolución de los flujos de trabajo en la medicina crítica exige una transición desde los modelos de optimización de antimicrobianos reactivos hacia una arquitectura de inteligencia biológica proactiva, denominada PROA 2.0. Como bien postulan (Hao et al., 2023) y (Nielsen et al., 2025), la eficacia de la gestión de fármacos en la sepsis no reside únicamente en la selección del compuesto, sino en la precisión de la metrología molecular que sustenta la decisión clínica. La integración de la secuenciación metagenómica shotgun de nanoporos (mNGS) permite disolver la dicotomía tradicional entre el diagnóstico microbiológico y la administración de la terapia, instaurando un sistema de vigilancia genómica que interroga, en tiempo real, el flujo de ácidos nucleicos del agresor y la respuesta inmunológica del hospedador (Nielsen et al., 2025).

10.3. Uso de la mNGS para la gestión de la duración de los tratamientos

La determinación de la duración óptima de la terapia antimicrobiana ha sido, históricamente, un ejercicio de empirismo basado en consensos temporales arbitrarios generalmente ciclos de 7 a 14 días que no capturan la heterogeneidad de la resolución biológica individual. La bioinformática clínica aplicada al ADN microbiano libre de células (cfDNA) propone una reingeniería de este paradigma mediante la monitorización de la cinética de depuración nucleotídica. Según analizan (Nielsen et al., 2025), el cfDNA microbiano circula en el compartimento plasmático como una huella molecular de la biomasa invasora, persistiendo incluso después de que los microorganismos hayan perdido su capacidad de replicación celular bajo la presión de antibióticos bactericidas.

Tabla 11

Aplicación de la mNGS en la gestión de la duración de los tratamientos

Etapas	Información obtenida mediante mNGS	Interpretación	Posible utilidad en la gestión terapéutica
Diagnóstico inicial	Identificación de microorganismos presentes en la muestra.	Permite establecer una hipótesis etiológica molecular.	Puede complementar las pruebas convencionales para orientar el tratamiento.
Caracterización del agente	Identificación taxonómica y características genéticas.	Permite conocer con mayor detalle el microorganismo detectado.	Puede aportar información adicional para seleccionar o ajustar estrategias terapéuticas.
Seguimiento temprano	Variación de las lecturas y cobertura del microorganismo entre muestras.	Permite observar tendencias en la señal molecular.	Puede complementar la evaluación de respuesta al tratamiento.
Seguimiento longitudinal	Comparación de perfiles microbianos en diferentes momentos.	Permite identificar persistencia, disminución o aparición de nuevos microorganismos.	Ayuda a contextualizar la evolución de una infección compleja.
Persistencia molecular	Detección continua de ADN o ARN del agente.	Puede indicar persistencia de material genético, pero no necesariamente de microorganismos viables.	Requiere correlación con clínica y pruebas adicionales antes de prolongar el tratamiento.
Disminución de señal	Reducción de lecturas o cobertura del microorganismo.	Puede ser compatible con disminución de la carga molecular.	Puede aportar evidencia complementaria de respuesta, sin constituir por sí sola criterio para suspender tratamiento.
Reaparición de señal	Incremento posterior de lecturas previamente disminuidas.	Puede sugerir persistencia, recurrencia o nueva exposición.	Puede justificar una reevaluación clínica y microbiológica.
Infección polimicrobiana	Identificación simultánea de diferentes microorganismos.	Permite reconocer una comunidad infecciosa potencialmente compleja.	Puede contribuir a revisar la cobertura del tratamiento.
Genes de resistencia	Identificación de determinantes genéticos asociados con resistencia antimicrobiana.	Aporta información sobre mecanismos potenciales de resistencia.	Puede apoyar la necesidad de pruebas fenotípicas y ajustes terapéuticos.
Correlación clínica	Integración de datos genómicos con evolución del paciente.	Permite determinar la relevancia clínica del hallazgo molecular.	Es indispensable para tomar decisiones sobre continuidad o modificación del tratamiento.
Decisión terapéutica	Integración de mNGS con cultivos,	Permite construir una evaluación multidimensional.	Puede contribuir a optimizar duración y espectro del tratamiento

antibiograma y biomarcadores.	cuando la evidencia clínica lo respalda.
-------------------------------	--

Nota: Elaboración propia a partir de (Nielsen et al., 2025),

El uso de la mNGS para gestionar la duración de los tratamientos marca un cambio hacia una vigilancia molecular más activa de las infecciones. Esto se debe a que permite observar cómo cambia la señal genética de los microorganismos a lo largo del tratamiento, en lugar de limitarse a un análisis solo en el momento del diagnóstico. Si se observa una reducción progresiva en las lecturas o en la cobertura de un microorganismo, esto puede indicar que su representación molecular está disminuyendo.

Por otro lado, si hay persistencia o reaparición, podría ser necesario investigar si se trata de una infección persistente, una recurrencia o una nueva adquisición. Sin embargo, es importante tener cuidado al interpretar estos resultados, ya que el ADN o ARN puede seguir siendo detectable incluso después de que los microorganismos hayan perdido su viabilidad. Por lo tanto, la persistencia molecular no siempre significa que haya un fracaso en el tratamiento.

La verdadera utilidad de la mNGS radica en complementar la información clínica y microbiológica, ofreciendo una perspectiva a largo plazo que puede ayudar a determinar si la evolución observada es coherente con una respuesta positiva o si hay razones para reconsiderar el enfoque. Así, la mNGS no debería ser un mecanismo automático para alargar o suspender tratamientos, sino más bien una herramienta que apoye decisiones personalizadas, teniendo en cuenta la evolución clínica, los resultados microbiológicos, la susceptibilidad a antimicrobianos y la evidencia molecular.

La mecánica de esta gestión se fundamenta en la cuantificación absoluta de la carga microbiana, medida en equivalentes genómicos por microlitro (GPM). Tal como demuestran (Tidbury et al., 2025) y (Nielsen et al., 2025), existe una correlación biológica entre la persistencia de señales genómicas elevadas y el riesgo de infecciones metastásicas o abscesos ocultos. En este contexto, una reducción exponencial de los niveles de GPM actúa como un biomarcador de "limpieza biológica", facultando al clínico para acortar la duración del tratamiento con una certidumbre técnica superior a la que ofrece la mera normalización de biomarcadores proteicos como la proteína C reactiva (CRP) o la procalcitonina (PCT), cuya cinética puede verse alterada por estados proinflamatorios no infecciosos (Nielsen et al., 2025).

La relevancia clínica de este enfoque es profunda para mitigar la toxicidad farmacológica y la presión selectiva sobre el resistoma del paciente. (Yin, s. f.) y (Y. Zhao et al., 2024) argumentan que la monitorización mediante mNGS permite identificar el

momento exacto en que la carga patogénica ha sido neutralizada, facilitando la interrupción temprana de fármacos nefrotóxicos o de último recurso. Esta capacidad de realizar una "farmacodinamia molecular" en tiempo real desplaza el objetivo del tratamiento desde el cumplimiento de un calendario cronológico hacia la restauración documentada de la esterilidad genómica, optimizando los desenlaces clínicos y reduciendo la incidencia de infecciones secundarias por pathobiontes oportunistas (Nielsen et al., 2025).

10.4. Integración de los resultados de metagenómica en la historia clínica electrónica

La utilidad de la metagenómica shotgun en el punto de atención (*point-of-care*) se ve comprometida si los datos nucleotídicos no son integrados de manera interoperable en la Historia Clínica Electrónica (HCE). La gestión de la "Big Data" genómica exige una infraestructura informática que transforme archivos crudos (FASTQ) en representaciones semánticas accionables para el intensivista. Como bien señalan (Kardjadj, 2025) y (Goktas & Grzybowski, 2025), la integración de la HCE con algoritmos de aprendizaje automático permite correlacionar automáticamente la carga microbiana detectada con los registros de tratamiento y las constantes vitales del paciente, creando un ecosistema de soporte a la decisión clínica (*Clínic Decision Support Systems*, CDSS).

La mecánica biofísica de esta integración requiere la estandarización de metadatos mediante marcos como el PHA4GE (*Public Health Alliance for Genomic Epidemiology*). Según detallan (Struelens et al., 2024) y (S. Casimiro-Soriguer et al., 2025), la inclusión de información sobre el linaje filogenético, los mecanismos de resistencia detectados normalizados mediante la Antibiotic Resistance Ontology (ARO) y los umbrales de significancia (GPM/RPM) debe ser automática para evitar errores de transcripción manual. El uso de biosensores portátiles conectados a la red hospitalaria facilita que el resultado de un "antibiograma genómico" sea visible en la HCE en menos de seis horas, permitiendo una desescalada antibiótica dirigida en el mismo turno asistencial (Struelens et al., 2024).

Además, la integración en la HCE permite una vigilancia epidemiológica hospitalaria sin precedentes. Tal como analizan (Maugeri et al., 2025) y (Rannon et al., 2025), la monitorización longitudinal de variantes estructurales y elementos genéticos móviles (MGEs) detectados por mNGS y almacenados en la HCE facilita la identificación inmediata de brotes clonales. Al mapear geográficamente la presencia de genes de carbapenemasas como *blaNDM-1* o *blaOXA-48* dentro del plano hospitalario, el sistema puede alertar sobre cadenas de

transmisión silente entre pacientes aparentemente no relacionados, transformando la HCE de un registro estático a una herramienta activa de control de infecciones (Struelens et al., 2024).

10.5. Educación médica continua: Interpretando informes de taxonomía agnóstica

El cambio de paradigma hacia el diagnóstico agnóstico donde se interroga la totalidad del paisaje microbiano sin objetivos prefijados impone un desafío educativo sustancial para la clase médica. La interpretación de informes de mNGS requiere que el clínico trascienda la lógica binaria del "positivo/negativo" de la PCR convencional. Como argumentan (Coll et al., 2024) y (Kurnat-Thoma, 2024), la educación médica continua debe centrarse en la comprensión de conceptos como la profundidad de cobertura, el ratio de lecturas por millón (RPM) y la probabilidad de asignación taxonómica, asegurando que la información genómica sea interpretada bajo un rigor doctoral estricto.

El mecanismo analítico fundamental que los clínicos deben dominar es la discriminación entre la patogenia invasora y el ruido genómico basal. (Nielsen et al., 2025) y (Albitar et al., 2023) subrayan que la extrema sensibilidad de los secuenciadores de nanoporos captura fragmentos nucleotídicos de translocación fisiológica o contaminantes ambientales del laboratorio (el "kit-oma"). Por ello, el clínico debe ser instruido en la adjudicación diagnóstica basada en umbrales cuantitativos, un hallazgo se considera relevante si su RPM supera significativamente al de los controles negativos y si se alinea con la firma transcriptómica del hospedador (por ejemplo, firmas de interferón para virus o de respuesta inflamatoria aguda para bacterias). Esta capacidad de "juicio genómico" es la que previene el sobrediagnóstico y garantiza que la mNGS no derive en un incremento injustificado del uso de antimicrobianos (Nielsen et al., 2025).

Asimismo, la educación debe abarcar la interpretación de los determinantes de resistencia "silentes" frente a los expresados. Tal como postulan (Alcock et al., 2023) y (Manzoor et al., 2025), la detección genotípica de un gen de resistencia debe contextualizarse mediante modelos de predicción de la Concentración Inhibitoria Mínima (CMI) *in silico*. Los programas de educación médica deben formar a los facultativos en el uso de herramientas como el Resistance Gene Identifier (RGI) para discernir entre mutaciones puntuales en genes diana (como *rpoB* en micobacterias) y la presencia de bombas de eflujo inespecíficas. Esta alfabetización molecular es el componente indispensable para que la metagenómica clínica se consolide como el nuevo estándar de oro en la gestión personalizada de las enfermedades infecciosas (Milburn et al., 2024).

10.5.1. Barreras institucionales para la adopción de la mNGS en hospitales secundarios

A pesar de la robustez técnica de la secuenciación de molécula única, su implementación en hospitales de segundo nivel enfrenta barreras estructurales que condicionan la equidad en el acceso a la medicina de precisión. La principal limitación biofísica y económica es el elevado coste inicial de la infraestructura de secuenciación y el procesamiento computacional de alta intensidad. Como bien analizan (Milburn et al., 2024) y (Tian et al., 2026), en entornos de recursos limitados o centros secundarios, la carencia de personal especializado en bioinformática clínica y la ausencia de flujos de trabajo validados localmente actúan como cuellos de botella críticos (Milburn et al., 2024).

La mecánica de estas barreras se observa en el fenómeno del "aislamiento tecnológico". Según detallan (Goktas & Grzybowski, 2025) y (Kardjadj, 2025), los hospitales secundarios suelen carecer de la conectividad necesaria para utilizar plataformas de análisis en la nube protegidas, lo que dificulta el manejo de los terabytes de información generados. Además, la incertidumbre sobre el reembolso por parte de los sistemas de seguridad social para pruebas de alto valor pero alto coste unitario desincentiva la inversión institucional. El análisis crítico de (Tian et al., 2026) sugiere que esta barrera económica es paradójica, ya que la mNGS ahorra costes sistémicos al reducir la estancia hospitalaria; no obstante, la contabilidad hospitalaria fragmentada a menudo no visualiza este ahorro indirecto (Nielsen et al., 2025).

Para superar estas restricciones, se propone el modelo de "redes de vigilancia genómica regional". Tal como exponen (S. Casimiro-Soriguer et al., 2025) y (Struelens et al., 2024), la centralización de la capacidad bioinformática en nodos de referencia permite que hospitales secundarios realicen la captura nucleotídica in situ mediante dispositivos portátiles de bajo aporte (como el MinION), delegando el procesamiento computacional complejo a centros de excelencia. Esta orquestación logística, apoyada en marcos regulatorios globales como el EU AI Act, garantiza que la innovación biotecnológica alcance a toda la población, mitigando el riesgo de que la medicina genómica se convierta en un privilegio de centros terciarios y asegurando una respuesta coordinada frente a las amenazas infecciosas globales (Struelens et al., 2024).

En conclusión, la integración de la metagenómica en los programas PROA representa la culminación de la reingeniería clínica del cuidado crítico. Al habilitar una gestión de la duración de tratamientos basada en la depuración genómica, automatizar la interoperabilidad en la HCE, capacitar a los clínicos en la taxonomía agnóstica y proponer soluciones regionales a las barreras institucionales, esta disciplina dota al sistema de salud de una inteligencia

biológica total. El desafío inmediato reside en la democratización del acceso a estos biosensores nucleotídicos, garantizando que cada bit de información genómica se traduzca en una vida salvada en la primera línea de la infectología del siglo XXI (Nielsen et al., 2025).

La arquitectura de la medicina crítica contemporánea atraviesa una transición disruptiva hacia lo que se ha denominado "Gestión de Antimicrobianos 2.0". Este nuevo paradigma no solo busca racionalizar el uso de fármacos, sino que integra la inteligencia biológica proactiva mediante el uso de la secuenciación metagenómica shotgun de nanoporos (mNGS). Como bien argumentan (Nielsen et al., 2025) y (Kumar et al., 2024), la eficacia de los programas PROA en la era genómica depende de la disolución de la latencia diagnóstica, transformando la microbiología de una disciplina observacional de crecimiento celular en una metrología molecular dinámica y agnóstica que interroga el flujo de ácidos nucleicos en tiempo real (Nielsen et al., 2025).

10.6. Modelos de reembolso y justificación económica frente a la gerencia hospitalaria

La adopción de tecnologías de secuenciación de molécula única en la práctica clínica habitual choca frecuentemente con la barrera de la contabilidad hospitalaria fragmentada, que a menudo prioriza el coste unitario del reactivo sobre el ahorro sistémico del episodio de cuidado. Sin embargo, la justificación económica doctoral de la mNGS trasciende el balance del laboratorio para centrarse en la reducción del intervalo de hospitalización inefectiva. Según analizan (Tian et al., 2026) y (Yin, s. f.), la implementación de flujos de trabajo metagenómicos permite un ajuste terapéutico dirigido en las primeras seis a doce horas, lo que correlaciona de manera lineal con una disminución de la estancia media en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) (Tian et al., 2026).

La mecánica biofísica de este ahorro se fundamenta en la prevención de la claudicación orgánica acumulada. Tal como señalan (Nielsen et al., 2025) y (Parhofer et al., 2026), existe una relación inversa entre la rapidez de la identificación genómica del patógeno y el incremento del score SOFA. Al minimizar el tiempo de exposición a una carga microbiana crítica medida en equivalentes genómicos por microlitro (GPM), se reduce la incidencia de fallo renal agudo inducido por fármacos nefrotóxicos de amplio espectro y se mitiga el riesgo de coinfecciones oportunistas, cuya gestión clínica representa un coste catastrófico para el sistema sanitario (Nielsen et al., 2025). Por lo tanto, los modelos de reembolso deben evolucionar hacia esquemas de "pago por valor" (*value-based healthcare*), donde la inversión en biosensores de

nanoporos sea compensada por la liberación temprana de camas de críticos y la reducción de las tasas de readmisión por complicaciones iatrogénicas (Goktas & Grzybowski, 2025).

Desde la perspectiva de la gestión gerencial, la justificación económica también reside en el rol de la mNGS como centinela de la epidemiología hospitalaria. Como bien exponen (Struelens et al., 2024) y (S. Casimiro-Soriguer et al., 2025), la capacidad de identificar brotes clonales silentes mediante vigilancia genómica regional previene cierres de unidades y diseminaciones comunitarias de patógenos pan-resistentes. El análisis económico doctoral sugiere que el coste evitado de un solo brote de bacterias productoras de carbapenemasas (CPE) detectado precozmente por mNGS absorbe el presupuesto anual de consumibles de secuenciación de un centro terciario (Struelens et al., 2024).

10.7. Impacto del diagnóstico molecular directo en la presión de selección de resistencias

La contención de la crisis global de resistencia antimicrobiana (AMR) exige una reingeniería de la presión selectiva en los ecosistemas hospitalarios. Históricamente, el uso de carbapenémicos y glicopéptidos durante el periodo de "ceguera diagnóstica" ha actuado como un motor evolutivo para la emergencia de clones resistentes. La irrupción del diagnóstico molecular directo mediante mNGS profunda ofrece una solución biológica para racionalizar esta presión. Al proporcionar el perfil del resistoma funcional de forma concomitante con la identidad taxonómica, la mNGS faculta al clínico para realizar una desescalada antibiótica dirigida con una certidumbre técnica superior a la que ofrece la mera estabilidad clínica subjetiva. Como bien detallan (Pinzauti et al., 2025) y (Govender et al., 2025), la detección temprana de la ausencia de genes determinantes de resistencia como *blaNDM*, *blaKPC* o *blaOXA-48* permite retirar regímenes de amplio espectro en menos de seis horas desde la sospecha clínica (Govender et al., 2025).

La mecánica biofísica de este impacto reside en la preservación de la arquitectura de la microbiota comensal del paciente. (Yin, s. f.) y (M. Zhao et al., 2024) han demostrado que el ajuste del tratamiento basado en datos metagenómicos ocurre en el 41.5% de los pacientes inmunocomprometidos, permitiendo una transición hacia agentes de espectro reducido que minimizan la deplesi3n de bacterias productoras de butirato. Esta protecci3n del microbioma intestinal es vital para reducir los eventos de translocaci3n sistémica y prevenir la colonizaci3n por pathobiontes hipervirulentos, rompiendo el ciclo de reinfecci3n por pat3genos multirresistentes que caracteriza al paciente crítico de larga estancia (Yin, s. f.).

Asimismo, el uso de modelos de aprendizaje automático integrados con bases de datos como el Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) permite predecir la Concentración Inhibitoria Mínima (CMI) *in silico* de los microorganismos detectados. Tal como postulan (Alcock et al., 2023) y (Manzoor et al., 2025), esta metrología molecular permite ajustar la dosis terapéutica para superar umbrales de resistencia de bajo nivel, optimizando la eficacia farmacológica y reduciendo la probabilidad de selección de mutantes resistentes bajo-dosificados. Esta capacidad de realizar una "farmacodinamia genómica" en tiempo real posiciona a la mNGS como la herramienta definitiva para la despresurización ecológica de las unidades de cuidados intensivos (Nielsen et al., 2025).

10.8. Auditoría y feedback en tiempo real basados en datos genómicos de la planta

La eficacia de los programas PROA se ve multiplicada cuando el microbiólogo clínico trasciende su rol analítico tradicional para consolidarse como un "Consultor de Datos Genómicos" que proporciona feedback dinámico a pie de cama. La bioinformática clínica de nanoporos facilita la creación de un flujo de información bidireccional entre el laboratorio y la planta de hospitalización. Según analizan (Alcock et al., 2023) y (Struelens et al., 2024), el uso de la Antibiotic Resistance Ontology (ARO) permite normalizar los informes metagenómicos, transformando señales nucleotídicas crudas en recomendaciones terapéuticas accionables que el intensivista puede interpretar de manera unívoca (Struelens et al., 2024).

La mecánica de esta auditoría genómica se apoya en la monitorización longitudinal de los elementos genéticos móviles (MGEs) que circulan en la planta. Como demuestran (Maugeri et al., 2025) y (Struelens et al., 2024), la secuenciación de lectura larga permite rastrear la transferencia horizontal de plásmidos de resistencia entre diferentes especies bacterianas dentro de una misma unidad, un fenómeno que los métodos convencionales de tipificación omiten sistemáticamente. Al detectar que un plásmido *blaKPC-3* presente en un aislado de *Klebsiella pneumoniae* ha translocado a una cepa de *Escherichia coli* en un paciente adyacente, el consultor de datos genómicos puede alertar al equipo de control de infecciones antes de que se manifieste un brote clínico manifiesto (Maugeri et al., 2025).

La relevancia clínica de este feedback en tiempo real se observa en la personalización de las guías de tratamiento empírico local. En lugar de basarse en antibiogramas acumulados semestrales, el feedback genómico permite ajustar los protocolos de la unidad en función del resistoma circulante detectado en la última semana. Esta agilidad analítica, integrada en la Historia Clínica Electrónica (HCE) mediante marcos de interoperabilidad como PHA4GE,

asegura que la "auditoría biológica" sea una parte intrínseca de la reanimación infecciosa, optimizando la asignación de recursos y maximizando la seguridad del paciente mediante una vigilancia genómica ubicua y de alta resolución (Struelens et al., 2024).

10.9. Controversias actuales, análisis crítico de la evidencia y perspectivas futuras

A pesar de la sofisticación técnica de la secuenciación de poros, la implementación sistémica de la mNGS enfrenta dilemas epistemológicos que condicionan su validación diagnóstica definitiva. La controversia más acuciante se centra en la interpretación de la "DNAemia basal" y el ruido genómico translocado. Como analizan (Nielsen et al., 2025) y (Ciaparrone et al., 2024), la ubicuidad de fragmentos de ADN microbiano en la sangre de individuos sanos impone el reto de definir umbrales de significancia clínica que no deriven en un sobre-tratamiento. El análisis crítico de la evidencia sugiere que un resultado positivo por mNGS debe ser validado integrando biomarcadores de inflamación del hospedador como las firmas de 29 mARN del panel TriVerity y la cuantificación absoluta en GPM, asegurando que la detección sea un reflejo de una invasión biológica verdadera y no un artefacto de la ultrasensibilidad técnica (Nielsen et al., 2025).

Otra área de intenso debate es la opacidad de los algoritmos de inteligencia artificial aplicados al diagnóstico infeccioso. (Goktas & Grzybowski, 2025) y (Kardjadj, 2025) advierten sobre el riesgo de las "cajas negras" en el llamado de taxones y la predicción de resistencia, donde el facultativo recibe una adjudicación diagnóstica sin visibilidad sobre la métrica de confianza subyacente. Es imperativo transitar hacia una IA explicable (XAI) que proporcione una trazabilidad absoluta del proceso de inferencia y que esté validada en ensayos clínicos aleatorizados multiescéntricos. Además, el fenómeno del "kit-oma" contaminación ambiental por ADN residente en reactivos exige el uso de controles negativos rigurosos y algoritmos de depleción digital para garantizar la veracidad analítica en muestras de baja biomasa microbiana (Nielsen et al., 2025).

Las perspectivas futuras se vislumbran en la convergencia de la metagenómica con la proteómica de nanoporos y los biosensores portátiles "wearables". (Van Dijk et al., 2023) y (Haghighy et al., 2024) anticipan el desarrollo de dispositivos integrados que realicen una monitorización multimodal de la infección y la respuesta inmune directamente en la piel o fluidos intersticiales, permitiendo una medicina de precisión ubicua y no invasiva. Asimismo, el uso de modelos de lenguaje de proteínas (PLM) permitirá identificar mecanismos de resistencia emergentes basándose en patrones estructurales conservados, superando los límites

del alineamiento por homología convencional (Van Dijk et al., 2023). En última instancia, la estandarización de marcos regulatorios como el EU AI Act asegurará que la innovación biotecnológica se traduzca en una reducción sistémica de la mortalidad global por enfermedades infecciosas, consolidando a la metagenómica shotgun como la piedra angular de la infectología del siglo XXI (Struelens et al., 2024).

En conclusión, la integración de la metagenómica en los programas PROA representa la culminación de la ingeniería diagnóstica del cuidado crítico. Al justificar su rentabilidad mediante el acortamiento de estancias, mitigar la presión selectiva a través de una desescalada precoz y empoderar al clínico con feedback genómico en tiempo real, esta tecnología dota al sistema sanitario de una inteligencia biológica total. El desafío reside en la validación clínica universal y en la democratización del acceso a biosensores de nanoporos, garantizando que cada bit de información genómica sea un catalizador para la preservación de la vida en la primera línea de la infectología crítica (Nielsen et al., 2025).

Capítulo XI

Vigilancia Epidemiológica Global y Metagenómica de Aguas Residuales

La arquitectura de la salud pública contemporánea ha experimentado una transición hacia modelos de inteligencia biológica descentralizada, donde la capacidad de interrogar el entorno biológico en tiempo real se ha convertido en el pilar fundamental de la seguridad sanitaria global. Como bien analizan (Struelens et al., 2024), la vigilancia genómica ya no se limita a la respuesta reactiva ante brotes clínicos manifiestos, sino que se ha consolidado como un sistema de monitorización continua y multimodal que integra datos del hospedador, del patógeno y del ecosistema ambiental. En este contexto, la metagenómica de aguas residuales y el monitoreo de la interfaz humano-animal representan la frontera más avanzada de la epidemiología de precisión, permitiendo la disolución de las fronteras geográficas y temporales que históricamente han favorecido la propagación de amenazas infecciosas (Struelens et al., 2024).

11.1. Monitoreo de la emergencia de patógenos con potencial pandémico en tiempo real

La monitorización de agentes infecciosos con capacidad de diseminación masiva exige una orquestación tecnológica que actúe en las fases presintomáticas de un evento epidémico. La "ceguera epidemiológica" tradicional, supeditada a la presentación de casos en centros hospitalarios, suele resultar en una intervención tardía. La bioinformática clínica aplicada a la vigilancia global propone el uso de la secuenciación metagenómica agnóstica para detectar señales biológicas inusuales antes de que se produzca una crisis de salud pública. Tal como postulan (Struelens et al., 2024) y (Agustinho et al., 2024), la implementación de biosensores portátiles de nanoporos facilita la captura de genomas completos en el punto de origen, transformando la logística de la vigilancia desde el envío de muestras a nodos centrales hacia el flujo digital de datos nucleotídicos en tiempo real.

La mecánica biofísica de este monitoreo se fundamenta en la capacidad de la secuenciación de lectura larga para resolver la complejidad estructural de genomas virales y bacterianos emergentes. Según detallan (Van Dijk et al., 2023) y (S. Casimiro-Soriguer et al., 2025), el uso de dispositivos como el MinION permite realizar una vigilancia genómica in situ por ejemplo, en mercados de animales vivos o zonas de alta densidad migratoria, identificando variantes que presentan mutaciones críticas en regiones determinantes de la patogenicidad. La relevancia clínica de esta celeridad es vital para la preparación pandémica; al acortar el intervalo de identificación desde semanas a horas, las autoridades sanitarias pueden

implementar medidas de contención no farmacológicas y acelerar el diseño de dianas diagnósticas y candidatos vacunales mediante estrategias de vacunología inversa (Van Dijk et al., 2023).

Tabla 12

Monitoreo en tiempo real de patógenos con potencial pandémico

Componente	Proceso	Información generada	Utilidad para la vigilancia
Secuenciación Nanopore	Lectura de moléculas de ADN o ARN mediante nanoporos.	Secuencias genéticas generadas progresivamente.	Facilita la disponibilidad temprana de información.
Análisis en tiempo real	Procesamiento de las lecturas mientras continúa la secuenciación.	Identificaciones preliminares y evolución de la cobertura.	Reduce el tiempo necesario para obtener una primera caracterización.
Identificación taxonómica	Comparación de las secuencias con bases de datos genómicas.	Identidad probable del microorganismo.	Permite reconocer agentes conocidos y señales inesperadas.
Detección de variantes	Comparación de las secuencias con genomas de referencia.	Mutaciones y cambios genéticos.	Permite seguir la evolución de los microorganismos.
Genes de resistencia	Búsqueda de determinantes genéticos asociados con resistencia.	Perfil genético potencial de resistencia.	Apoya la vigilancia de amenazas antimicrobianas emergentes.
Factores de virulencia	Identificación de genes o regiones asociadas con características de virulencia.	Evidencia genética complementaria.	Puede contribuir a priorizar hallazgos que requieren investigación adicional.
Análisis filogenético	Comparación de genomas entre muestras y aislamientos.	Relaciones evolutivas y genéticas.	Ayuda a investigar posibles cadenas de transmisión.
Análisis epidemiológico	Integración de información genómica con casos, tiempo y localización.	Patrones de distribución y transmisión.	Permite evaluar la importancia epidemiológica de un hallazgo.
Sistema de alerta	Establecimiento de criterios para identificar señales inusuales.	Notificación de eventos que requieren evaluación.	Facilita una respuesta temprana de los equipos de vigilancia.
Confirmación	Validación mediante métodos independientes y revisión especializada.	Confirmación o descarte del hallazgo.	Reduce el riesgo de falsas alarmas.
Comunicación	Transferencia de información a laboratorios	Reportes técnicos y epidemiológicos.	Favorece la coordinación de las medidas de respuesta.
Vigilancia longitudinal	Seguimiento continuo de los microorganismos identificados.	Cambios en frecuencia, diversidad y características genéticas.	Permite observar la evolución de una amenaza a lo largo del tiempo.

Nota: Elaboración propia a partir de (Struelens et al., 2024).

El seguimiento de microorganismos con potencial de pandemia mediante la secuenciación en tiempo real no solo busca localizar casos, sino que también facilita la observación continua de las alteraciones genéticas y epidemiológicas de estos agentes. La tecnología de Nanopore produce datos de manera continua, lo que permite analizar las primeras lecturas mientras la secuenciación sigue adelante. Esto puede acelerar la identificación de agentes conocidos, variantes inesperadas o indicios que requieren una revisión más detallada.

La velocidad debe acompañarse de rigor, ya que una detección inicial puede verse afectada por contaminación, errores en la secuenciación, bases de datos incompletas o interpretaciones incorrectas de las variantes genéticas. Por lo tanto, un sistema eficaz debe incluir la recolección de datos, el basecalling, el control de calidad, la clasificación taxonómica, el análisis genómico y filogenético, la evaluación epidemiológica y los métodos de confirmación anteriormente a emitir una alerta de salud.

Además, la integración de información de diferentes regiones y momentos permite identificar patrones que serían complicados de descubrir mediante análisis individuales, especialmente en situaciones de aumento inesperado de casos o dispersión geográfica. En este marco, la metagenómica en tiempo real puede convertirse en una herramienta fundamental para prepararnos para futuras emergencias sanitarias, al proporcionar información molecular que asista en la detección, caracterización, comparación y seguimiento de la evolución de los patógenos, fortaleciendo nuestra capacidad de respuesta antes de que una señal localizada se transforme en un evento más amplio.

Además, como argumentan (Kardjadj, 2025) y (Goktas & Grzybowski, 2025), la integración de marcos regulatorios globales, como el EU AI Act, asegura que la inteligencia artificial (IA) utilizada para el filtrado de señales de "amenaza biológica" opere bajo principios de transparencia y explicabilidad. La monitorización en tiempo real se beneficia de algoritmos de aprendizaje profundo que escanean longitudinalmente el viroma y el microbioma global, detectando desviaciones estadísticas en la abundancia taxonómica que actúan como centinelas de un evento de desbordamiento (*spillover*). Esta orquestación molecular es la que permite que el sistema sanitario evolucione de una medicina de catástrofe hacia una vigilancia proactiva que salvaguarda la integridad homeostática de la población global (Struelens et al., 2024).

11.1.1. Secuenciación de aguas residuales (Wastewater surveillance) como sistema de alerta temprana

La vigilancia de aguas residuales constituye la aplicación más disruptiva de la metagenómica ambiental para la salud pública, actuando como una "biopsia líquida comunitaria". Fisiopatológicamente, los individuos infectados incluso aquellos en fase asintomática o prodrómica excretan fragmentos nucleotídicos del patógeno a través de las heces y secreciones respiratorias, los cuales convergen en el sistema de alcantarillado urbano. Como bien exponen (Manzoor et al., 2025) y (Struelens et al., 2024), la mNGS profunda aplicada al lodo cloacal permite detectar la presencia de virus respiratorios, patógenos entéricos y genes de resistencia antimicrobiana (AMR) semanas antes de que estos se manifiesten en las estadísticas de urgencias hospitalarias.

La mecánica técnica de la vigilancia en aguas residuales exige protocolos de concentración de partículas virales y purificación de ácidos nucleicos altamente eficientes. Tal como analizan (D. Lu et al., 2025) y (Agustinho et al., 2024), el uso de la secuenciación metagenómica shotgun permite interrogar de manera agnóstica el contenido total de la muestra, superando las limitaciones de la PCR cuantitativa (qPCR) que solo busca objetivos predefinidos. Para resolver la baja biomasa microbiana en matrices ambientales complejas, la bioinformática de nanoporos utiliza umbrales de sensibilidad optimizados, como el criterio de "Nudged" en plataformas como CZ ID, que permite identificar taxones raros al flexibilizar los parámetros de alineamiento a cambio de un análisis doctoral exhaustivo de la veracidad de la señal (Manzoor et al., 2025).

La relevancia de la monitorización de aguas residuales trasciende la mera identificación taxonómica para adentrarse en el mapeo del resistoma poblacional. Según el análisis de (Struelens et al., 2024), la secuenciación de aguas residuales en más de 100 países ha revelado el paisaje global de la resistencia, permitiendo predecir la emergencia de bacterias productoras de carbapenemasas (*blaKPC*, *blaNDM*) en nichos geográficos específicos. Esta metrología ambiental faculta a los hospitales locales para ajustar sus protocolos de terapia empírica basándose en la carga de resistencia circulante en su área de influencia, optimizando el uso de antimicrobianos y reduciendo la presión selectiva que impulsa la crisis de la multirresistencia (Nielsen et al., 2025).

11.1.2. Seguimiento de la evolución viral y deriva antigénica mediante secuenciación masiva

La capacidad de rastrear la trayectoria evolutiva de los virus en circulación es fundamental para garantizar la eficacia persistente de las intervenciones diagnósticas y terapéuticas. La deriva antigénica, mediada por la acumulación de mutaciones de nucleótido único (SNPs) y eventos de recombinación genómica, permite que los patógenos evadan la inmunidad humoral previamente adquirida. Como bien ilustran (S. Casimiro-Soriguer et al., 2025) en su estudio sobre el circuito de vigilancia de Andalucía, la secuenciación sistemática de más de 42,500 genomas permitió monitorizar la transición dinámica entre clados, desde las variantes Alpha y Delta hasta la diversificación masiva de los linajes de Omicron y sus formas recombinantes (XBB, XEC).

La mecánica biofísica de este seguimiento se apoya en la integración de la filogenómica con el análisis estructural de proteínas. Tal como detallan (Van Dijk et al., 2023) y (Agustinho et al., 2024), la secuenciación de lectura larga facilita la reconstrucción de genomas haplotípicos completos, permitiendo identificar variantes estructurales que las lecturas cortas de Illumina a menudo omiten o fragmentan. El uso de herramientas de visualización dinámica, como el servidor local de Nextstrain implementado por (S. Casimiro-Soriguer et al., 2025), proporciona a los epidemiólogos una visión en tiempo real de la propagación geográfica y el ritmo de sustitución nucleotídica. Esta información es la que dicta las decisiones de salud pública sobre la composición de las vacunas estacionales y la idoneidad de los anticuerpos monoclonales disponibles, asegurando que la medicina de precisión se ajuste a la realidad biológica del virus circulante (Van Dijk et al., 2023).

La relevancia clínica de monitorizar la evolución viral es particularmente crítica en el escenario del paciente inmunocomprometido. Según sugieren (Yin, s. f.) y (Struelens et al., 2024), los hospederos con inmunodeficiencias actúan como aceleradores evolutivos donde el virus puede persistir durante meses, acumulando mutaciones que luego pueden dar lugar a nuevas variantes de preocupación (VOC). La integración de la mNGS clínica con la vigilancia epidemiológica comunitaria permite cerrar el círculo de la transmisión, identificando brotes hiper-mutantes en etapas tempranas. Esta orquestación técnica, apoyada en el uso de estándares de metadatos como el PHA4GE, garantiza que cada secuencia generada contribuya a una base de conocimiento global interoperable, permitiendo una respuesta coordinada frente a la deriva patogénica en un mundo interconectado (Yin, s. f.).

11.2. Identificación de reservorios animales de enfermedades zoonóticas

El origen de la mayoría de las amenazas infecciosas pandémicas reside en eventos de zoonosis, donde la claudicación de las barreras interespecies permite que un patógeno animal colonice exitosamente al ser humano. La vigilancia genómica bajo el enfoque de "Una Sola Salud" (One Health) es imperativa para identificar los reservorios naturales y los hospederos intermediarios antes de que se produzca el salto epidemiológico definitivo. Como bien argumentan (Struelens et al., 2024) y (Manzoor et al., 2025), la comparación de secuencias genómicas obtenidas de fauna silvestre, ganado y pacientes clínicos permite realizar una reconstrucción filodinámica que localiza geográficamente el epicentro del brote.

La mecánica analítica de la vigilancia zoonótica se apoya en el uso de la metagenómica shotgun profunda para interrogar biomasas complejas en muestras animales. Tal como postulan (Agustinho et al., 2024) y (Van Dijk et al., 2023), la capacidad de los nanoporos para secuenciar ADN y ARN nativos facilita la identificación de virus de ARN altamente divergentes que suelen habitar en reservorios como quirópteros o aves migratorias. Al ensamblar genomas completos de novo (MAGs) a partir de muestras ambientales, los investigadores pueden descubrir patógenos "invisibles" para la microbiología convencional. Un ejemplo notable es la caracterización de ortobunyavirus en ganado europeo o secuencias homólogas a SARS-CoV-2 en pangolines, facilitada por la captura agnóstica de señales nucleotídicas (Van Dijk et al., 2023).

La relevancia de identificar estos reservorios radica en la prevención de la diseminación de la resistencia antimicrobiana inter-nicho. Según el análisis doctoral de (Manzoor et al., 2025) y (Struelens et al., 2024), el flujo de plásmidos de resistencia entre el entorno agrícola y el clínico es un motor primario de la AMR global. La vigilancia genómica regional permite rastrear el uso de antibióticos en ganadería y su correlación con la emergencia de patógenos multirresistentes en humanos, como ha ocurrido con el gen *mcr-1* de resistencia a colistina. En última instancia, la mNGS se posiciona como el lenguaje común que une la infectología veterinaria con la medicina humana, proporcionando una inteligencia biológica total que permite predecir y mitigar las crisis sanitarias del siglo XXI mediante una vigilancia ubicua y científicamente rigurosa (Manzoor et al., 2025).

En conclusión, la vigilancia epidemiológica global potenciada por la metagenómica de aguas residuales y el enfoque One Health representa la culminación de la reingeniería de la salud pública. Al habilitar el monitoreo de patógenos en tiempo real, convertir el alcantarillado en un sensor biológico inteligente, rastrear la deriva antigénica de los virus y desactivar las

amenazas zoonóticas en su origen, esta tecnología dota a la humanidad de una visión omnisciente. El desafío futuro reside en la estandarización universal de los flujos de trabajo genómicos y en la democratización del acceso a biosensores de nanoporos, garantizando que la información molecular de alta resolución sea el escudo definitivo frente a las pandemias del futuro (Agustinho et al., 2024).

La arquitectura de la salud pública contemporánea ha experimentado una metamorfosis radical, desplazando el eje de gravedad desde la respuesta reactiva ante brotes clínicos manifiestos hacia un modelo de inteligencia biológica descentralizada y ubicua. Como bien analizan (Struelens et al., 2024) y (S. Casimiro-Soriguer et al., 2025), la vigilancia genómica en tiempo real se ha consolidado como el pilar fundamental de la seguridad sanitaria global, permitiendo la disolución de las barreras temporales que históricamente favorecieron la propagación silenciosa de patógenos con potencial pandémico (Struelens et al., 2024). En este ecosistema, la metrología molecular profunda no solo interroga al agente agresor, sino que decodifica la dinámica evolutiva de poblaciones microbianas enteras en diversos nichos ecológicos, instaurando una era de epidemiología de precisión (Agustinho et al., 2024).

11.3. Cooperación internacional en el intercambio de datos genómicos abiertos

La eficacia de la vigilancia epidemiológica global depende intrínsecamente de la porosidad y transparencia de las fronteras informáticas. Los principios de encontrabilidad, accesibilidad, interoperabilidad y reutilización (FAIR) constituyen la gramática ética sobre la cual se edifica la ciencia abierta moderna (Manzoor et al., 2025). Según exponen (Struelens et al., 2024), la integración de redes de vigilancia como el Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) y plataformas como GISAID permite que la detección de una variante inusual en un nodo geográfico remoto active protocolos de preparación diagnóstica a escala mundial en cuestión de horas.

La mecánica de esta cooperación trasciende el simple almacenamiento de archivos nucleotídicos; exige la estandarización rigurosa de metadatos contextuales. Tal como analizan (Bavaro et al., 2023) y (Struelens et al., 2024), el uso de marcos como el Public Health Alliance for Genomic Epidemiology (PHA4GE) garantiza que las secuencias compartidas incluyan información vital sobre la temporalidad, la ubicación y el desenlace clínico del hospedador, permitiendo realizar inferencias filodinámicas robustas (Struelens et al., 2024). La relevancia doctoral de este intercambio reside en la superación de la "soberanía viral" que ha obstaculizado históricamente la respuesta ante zoonosis emergentes. Como argumentan (Hala et al., 2024) y

(Struelens et al., 2024), la creación de infraestructuras de datos abiertos mitiga el acaparamiento de información (*data hoarding*) y fomenta un reconocimiento conjunto de la autoría académica, alineando los intereses de la investigación clínica con los imperativos de seguridad biológica internacional (Struelens et al., 2024).

Además, la gobernanza de estos datos exige una supervisión ética asistida por marcos regulatorios como el EU AI Act. Según (Goktas & Grzybowski, 2025) y (Kardjadj, 2025), la inteligencia artificial utilizada para el escrutinio de bases de datos genómicas masivas debe operar bajo principios de transparencia y explicabilidad (XAI). Esta orquestación técnica es la que permite que el intercambio global no sea una mera acumulación de FASTQ, sino una inteligencia colectiva capaz de predecir eventos de desbordamiento (*spillover*) antes de que se produzca una transmisión interhumana sostenida, transformando la preparación pandémica de un ejercicio defensivo a una vigilancia proactiva y pro-ética (Struelens et al., 2024).

11.3.1. Uso de la mNGS en el rastreo de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos

El rastreo de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) ha sido revolucionado por la transición desde el tipificado de secuencias multilocus (MLST) hacia la secuenciación de genoma completo (WGS) y la metagenómica shotgun (mNGS). Fisiopatológicamente, la contaminación de la cadena de suministro alimentario a menudo involucra reservorios ambientales complejos donde el patógeno elude el enriquecimiento convencional. Como bien analizan (Ahannach et al., 2021) y (Struelens et al., 2024), la implementación de PulseNet International ha instaurado un estándar de oro basado en la resolución de nucleótido único, permitiendo una discriminación taxonómica de alta fidelidad que identifica brotes vinculados a fuentes geográficamente distantes.

La mecánica técnica de este rastreo se apoya en la comparación de distancias genómicas medidas en polimorfismos de nucleótido único (SNPs). Según detallan (Struelens et al., 2024), la identificación de menos de 10 SNPs entre aislados de *Salmonella enterica* recuperados de un paciente clínico y una muestra de procesamiento industrial constituye una evidencia biometrológica definitiva de un ancestro común reciente. Esta capacidad de "huella dactilar genómica" es vital para la resolución de brotes por patógenos de baja biomasa o crecimiento lento, como *Listeria monocytogenes*. Tal como demuestran (Struelens et al., 2024), la secuenciación sistemática en tiempo real ha acortado el intervalo de detección de brotes de listeriosis, permitiendo la retirada masiva de productos contaminados antes de que se multipliquen las fatalidades (Struelens et al., 2024).

La irrupción de la mNGS agnóstica añade una capa adicional de profundidad al rastreo de ETAs al permitir la detección de agentes infecciosos "invisibles" para los paneles de PCR predefinidos. Como exponen (Agustinho et al., 2024) y (Struelens et al., 2024), la captura nucleotídica directa de matrices alimentarias complejas como productos lácteos o cárnicos facilita la identificación de variantes hipervirulentas portadoras de islas de patogenicidad emergentes. Al integrar estos datos con algoritmos de aprendizaje automático para la predicción de la fuente (source tracking), las autoridades sanitarias pueden localizar el epicentro de la contaminación en la interfaz agrícola-industrial, optimizando la asignación de recursos de inspección y minimizando el impacto económico sobre los sistemas agroalimentarios globales (Q. Zhang et al., 2023).

11.3.2. Mapeo global del resistoma ambiental y su conexión con la salud humana (One Health)

La gestión de la crisis de resistencia antimicrobiana (AMR) exige comprender el flujo de genes de resistencia a través de los compartimentos humano, animal y ambiental, una tríada conceptualizada bajo el enfoque de "Una Sola Salud" (One Health). La metagenómica shotgun de lectura larga se posiciona como la herramienta definitiva para este mapeo funcional. Según el análisis doctoral de (Struelens et al., 2024), la secuenciación de aguas residuales urbanas actúa como un biosensor poblacional que refleja el paisaje de la resistencia circulante en comunidades enteras sin la necesidad de muestreo clínico individualizado.

La mecánica biofísica de esta conexión se fundamenta en la dinámica de la transferencia horizontal de genes (HGT). Tal como analizan (Maugeri et al., 2025) y (Alcock et al., 2023), el uso de la secuenciación por nanoporos permite resolver la estructura completa de plásmidos y elementos genéticos móviles (MGEs) que flanquean a los genes de resistencia (ARGs). Al identificar la coocurrencia de genes como *blaKPC* o *mcr-1* en el metagenoma del lodo cloacal y correlacionarlos con aislados clínicos locales, se puede trazar la trayectoria de la resistencia desde el entorno agrícola mediado por el uso de antibióticos en ganadería hacia el entorno hospitalario (Alcock et al., 2023). Este mapeo es fundamental para predecir la emergencia de patógenos pan-resistentes en nichos geográficos específicos, facultando a los sistemas de salud para ajustar sus guías de terapia empírica basándose en la carga de resistencia ambiental predominante (Struelens et al., 2024).

Además, la integración de bases de datos como el Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) con modelos de inteligencia artificial permite un fenotipado predictivo del

resistoma global. Como bien señalan (Manzoor et al., 2025) y (Alcock et al., 2023), el uso de la Antibiotic Resistance Ontology (ARO) facilita la normalización de las anotaciones genómicas procedentes de 101 países, creando un archivo dinámico del "bioma de resistencia" planetario (Manzoor et al., 2025). Esta metrología ambiental es la que permitirá que el control de la AMR transite hacia un modelo de gestión ecológica, donde la mitigación de la presión antibiótica en los efluentes hospitalarios y agrícolas se convierta en una intervención de salud pública tan crítica como la desescalada farmacológica a pie de cama, garantizando la preservación de la eficacia antimicrobiana para las futuras generaciones (Struelens et al., 2024).

11.4. Filogenómica de alta resolución para la identificación de cadenas de transmisión

La resolución final de los enigmas epidemiológicos reside en la capacidad de la filogenómica para reconstruir la trayectoria de los linajes infecciosos con precisión sub-clonal. A diferencia de los métodos de tipificación convencionales, la filogenómica de alta resolución emplea la totalidad de la información genómica para identificar variantes estructurales y microevolutivas que actúan como marcadores de transmisión. Como bien ilustran (S. Casimiro-Soriguer et al., 2025) en su estudio sobre el circuito de vigilancia de Andalucía, el procesamiento unificado de más de 42,500 genomas mediante tuberías bioinformáticas robustas permite mapear la evolución de virus respiratorios y bacterias nosocomiales en tiempo real.

La mecánica analítica de esta identificación se basa en modelos de inferencia filogenética bayesiana. Tal como postulan (Agustinho et al., 2024), la integración de datos de secuenciación con metadatos espaciales y temporales permite calcular la tasa de sustitución nucleotídica y determinar el intervalo de tiempo transcurrido desde el último ancestro común. Esta capacidad es vital para discernir si un incremento de casos en una unidad de cuidados intensivos representa una cadena de transmisión nosocomial activa o múltiples introducciones independientes desde la comunidad. Según analizan (Struelens et al., 2024), durante el brote multicéntrico de viruela símica (mpox) en 2022, la filogenómica facilitó la identificación de mutaciones de microevolución que revelaron la dinámica de propagación en redes sociales específicas, orientando las intervenciones de salud pública de manera quirúrgica y proporcionada (Struelens et al., 2024).

Desde la perspectiva de la neurología de precisión y las infecciones críticas, la filogenómica de lectura larga ofrece la ventaja de resolver haplotipos complejos. (Agustinho et al., 2024) y (Van Dijk et al., 2023) subrayan que la capacidad de los nanoporos para generar

lecturas ultra-largas permite atravesar regiones repetitivas y transponibles, facilitando la reconstrucción de genomas ensamblados desde metagenomas (MAGs) con una integridad estructural superior a la obtenida mediante lecturas cortas de Illumina. Esta precisión permite identificar linajes hiper-mutantes que actúan como "reservorios de deriva antigénica" en pacientes inmunocomprometidos, cerrando el círculo de la vigilancia molecular (Van Dijk et al., 2023). En última instancia, la filogenómica se consolida como el lenguaje universal de la epidemiología moderna, transformando el flujo de ácidos nucleicos en una cartografía dinámica que guía la medicina de precisión en los límites de la supervivencia biológica (Struelens et al., 2024).

En conclusión, la vigilancia epidemiológica global potenciada por la metagenómica de aguas residuales y el intercambio de datos abiertos representa el cenit de la reingeniería de la salud pública. Al habilitar la detección de brotes de ETA con resolución de SNP, mapear el resistoma global bajo el enfoque One Health y reconstruir cadenas de transmisión mediante filogenómica de alta resolución, esta tecnología dota a la humanidad de una visión omnisciente frente a la agresión microbiana. El desafío reside en garantizar la sostenibilidad de estas redes y la equidad en el acceso a biosensores genómicos, asegurando que cada bit de información nucleotídica sea un catalizador para la preservación de la integridad homeostática de la población global (Agustinho et al., 2024).

La reingeniería de la salud pública contemporánea ha desplazado el eje de gravedad desde la respuesta reactiva ante crisis sanitarias hacia una inteligencia biológica descentralizada y ubicua. Este cambio de paradigma, fundamentado en la capacidad de interrogar el material genético del entorno en tiempo real, constituye la base de la seguridad biológica del siglo XXI. Como bien argumentan (Struelens et al., 2024) y (S. Casimiro-Soriguer et al., 2025), la vigilancia genómica masiva ha permitido la disolución de las barreras temporales que históricamente favorecieron la propagación silenciosa de patógenos con potencial pandémico, instaurando un modelo de epidemiología de precisión que integra datos del agresor, del hospedador y del ecosistema ambiental (Struelens et al., 2024).

11.5. Implementación de la metagenómica en regiones con infraestructura de laboratorio limitada

La democratización del diagnóstico molecular profundo en entornos de recursos limitados representa uno de los desafíos más ambiciosos de la metrología genómica actual. Históricamente, el acceso a la secuenciación de nueva generación (NGS) estaba restringido a

centros de excelencia con infraestructuras de alta complejidad y personal altamente especializado. No obstante, la irrupción de la tecnología de nanoporos ha catalizado una descentralización biotecnológica. Según detallan (Struelens et al., 2024), iniciativas como la Africa Pathogen Genomics Initiative han movilizado inversiones masivas para instaurar capacidades de secuenciación en regiones donde la latencia diagnóstica era el principal impulsor de la mortalidad (Struelens et al., 2024).

La mecánica biofísica que permite esta implementación en nichos de baja infraestructura se basa en la simplificación de los procesos preanalíticos. Tal como analizan (Agustinho et al., 2024) y (Van Dijk et al., 2023), la secuenciación de molécula única de nanoporos reduce significativamente la dependencia de reactivos para la construcción de bibliotecas y de ciclos térmicos complejos. La utilización de protocolos de preparación rápida como el *rapid barcoding* permite procesar muestras clínicas o ambientales con un aporte mínimo de ADN (150 ng a 1 µg), facilitando la captura nucleotídica directamente en el punto de necesidad (Van Dijk et al., 2023). Además, como postulan (Marchukov et al., 2023) y (Payne et al., 2024), el uso del muestreo adaptativo (*adaptive sampling*) permite la deplesi3n digital del material genético inespecífico sin necesidad de kits químicos costosos, lo que optimiza la relación señal-ruido en muestras con alto trasfondo genómico del hospedador, una ventaja crítica en hospitales secundarios de países en desarrollo (Nielsen et al., 2025).

Desde el punto de vista bioinformático, la limitación de la potencia de cómputo local se ha resuelto mediante el despliegue de arquitecturas en la nube. (Meng et al., 2025) explican que plataformas como BugSeq o Pathogenwatch permiten que los datos crudos generados en laboratorios remotos sean analizados en servidores centrales de alta intensidad, devolviendo informes taxonómicos y perfiles de resistencia predictivos en cuestión de horas (Meng et al., 2025). Esta orquestación logística es la que permite que el manejo de enfermedades como la malaria o la tuberculosis multidrogorresistente transite hacia una medicina de precisión basada en la vigilancia genómica regional, mitigando la inequidad en salud mediante una metrología de vanguardia (Milburn et al., 2024).

11.5.1. El rol de la secuenciación portátil en misiones de respuesta rápida de la OMS

La capacidad de respuesta ante eventos de desbordamiento zoonótico (*spillover*) o brotes epidémicos inusuales depende de la prontitud con la que se capture la huella molecular del agresor. En este escenario, la secuenciación portátil actúa como la "punta de lanza" de las misiones de respuesta rápida de organismos internacionales. Como bien señalan (Struelens

et al., 2024), durante el brote de Ébola en África Occidental, el uso de dispositivos MinION permitió realizar un seguimiento filogenético en tiempo real, identificando cadenas de transmisión y eventos de microevolución viral en áreas de difícil acceso geográfico (Struelens et al., 2024).

La relevancia técnica de esta aproximación reside en la agosticidad taxonómica de la mNGS. A diferencia de los paneles de PCR multiplexados que se limitan a dianas predefinidas, la secuenciación shotgun interroga la totalidad de la biomasa nucleotídica, permitiendo la detección de virus emergentes o variantes hipervirulentas imprevistas. Tal como analizan (S. Casimiro-Soriguer et al., 2025) y (Coll et al., 2024), la integración de protocolos de depleción selectiva y enriquecimiento viral como el uso de nucleasas antes de la extracción de ácidos nucleicos incrementa la sensibilidad de detección en varios órdenes de magnitud, facilitando el descubrimiento de patógenos "invisibles" para los métodos convencionales (Agustinho et al., 2024).

Además, el rol de la secuenciación portátil en misiones de la OMS se extiende al diseño de estrategias de intervención biológica. Según proponen (Struelens et al., 2024), la obtención rápida de genomas completos *in situ* permite aplicar principios de vacunología inversa, identificando candidatos a epítomos inmunogénicos semanas antes de lo que permitían las metodologías tradicionales. Esta celeridad biometrológica es fundamental para la preparación pandémica global; al transformar el flujo digital de datos en una base de conocimiento compartida bajo principios FAIR, las misiones internacionales pueden orquestar una respuesta coordinada que incluya el ajuste dinámico de pruebas diagnósticas y la monitorización de la deriva antigénica frente a anticuerpos monoclonales, garantizando la eficacia de las medidas de contención en las fases críticas del brote (Van Dijk et al., 2023).

11.5.2. Controversias actuales, análisis crítico de la evidencia y perspectivas futuras

A pesar de la sofisticación técnica de la secuenciación de poros, su integración sistémica enfrenta controversias epistemológicas que condicionan su aplicabilidad universal. El debate más intenso se centra en el fenómeno del "kit-oma" o contaminación ambiental por ADN residente en los reactivos de laboratorio. Como analizan (Nielsen et al., 2025), la extrema sensibilidad de los secuenciadores de nanoporos capaces de detectar una sola molécula puede derivar en falsos diagnósticos positivos si no se aplican protocolos de biorremediación digital rigurosos. El análisis crítico de la evidencia sugiere que un hallazgo metagenómico solo debe considerarse clínicamente relevante cuando su abundancia relativa supera un ratio de lecturas

por millón (RPM) diez veces superior al nivel basal detectado en los controles negativos (Nielsen et al., 2025).

Otra controversia fundamental reside en la gobernanza de datos y la soberanía viral. (Struelens et al., 2024) advierten que el intercambio de datos genómicos abiertos, aunque vital para la salud pública, choca frecuentemente con intereses de propiedad intelectual y los principios del Protocolo de Nagoya sobre el acceso a recursos genéticos. Es imperativo transitar hacia marcos éticos que garanticen una atribución equitativa y protejan la privacidad del hospedador, evitando que el acaparamiento de datos (*data hoarding*) obstaculice la respuesta global ante amenazas infecciosas (Struelens et al., 2024). Asimismo, la opacidad de los algoritmos de inteligencia artificial utilizados para la adjudicación diagnóstica genera escepticismo. Tal como argumentan (Goktas & Grzybowski, 2025) y (Kardjadj, 2025), es necesario avanzar hacia una IA explicable (XAI) validada en ensayos clínicos que asegure que el razonamiento automatizado sea supervisado por el juicio doctoral (Goktas & Grzybowski, 2025).

Las perspectivas futuras se vislumbran en la convergencia de la metagenómica con la transcriptómica dual y la medicina personalizada. (D. Lu et al., 2025) y (Haghighat et al., 2024) anticipan el desarrollo de biosensores portátiles "wearables" que realicen una monitorización multimodal de la infección y la respuesta inmune directamente en la piel o fluidos intersticiales, permitiendo una vigilancia genómica ubicua y no invasiva (Haghighat et al., 2024). La evolución hacia la proteómica de nanoporos facilitará la detección de modificaciones postraduccionales que regulan la virulencia bacteriana en tiempo real (Van Dijk et al., 2023). En última instancia, la estandarización de marcos regulatorios como el EU AI Act proporcionará la gobernanza necesaria para asegurar que la información molecular de alta resolución se traduzca en una reducción sistémica de la mortalidad por sepsis y enfermedades emergentes, consolidando a la metagenómica shotgun como la piedra angular de la infectología del siglo XXI (Struelens et al., 2024).

En conclusión, la vigilancia epidemiológica global potenciada por la metagenómica de aguas residuales y la secuenciación portátil representa el cenit de la ingeniería diagnóstica del cuidado crítico. Al superar las barreras de infraestructura en regiones limitadas, empoderar las misiones de respuesta rápida con datos filogenéticos en tiempo real y abordar críticamente los desafíos éticos de la IA y la contaminación, esta tecnología dota al sistema sanitario de una visión omnisciente. El desafío reside en garantizar la sostenibilidad de estas redes y la democratización del acceso a biosensores de nanoporos, asegurando que cada bit de

información genómica sea un catalizador para la preservación de la vida humana en un planeta biológicamente interconectado (Nielsen et al., 2025).

Capítulo XII

Bioética del Big Data Genómico y el Futuro del Diagnóstico Autónomo

La convergencia entre la metrología genómica de ultra-alta resolución y la computación avanzada ha instaurado un nuevo paradigma en la medicina crítica, donde la capacidad de captura de información biológica supera con creces los marcos regulatorios y éticos tradicionales. La transición hacia el diagnóstico agnóstico aquel que no busca un patógeno específico, sino que interroga la totalidad de la biomasa nucleotídica en un fluido estéril impone una reevaluación doctoral de la autonomía del paciente y la seguridad de sus datos (Struelens et al., 2024). Como bien analizan (Goktas & Grzybowski, 2025), el tránsito de la microbiología observacional a la vigilancia molecular profunda no es solo un avance técnico, sino un desafío epistemológico que pone en riesgo la preservación del anonimato individual frente a la necesidad colectiva de seguridad biosanitaria (Goktas & Grzybowski, 2025).

12.1. Privacidad del paciente en la era del metagenoma

La mecánica biofísica de la secuenciación metagenómica shotgun de lectura larga (mNGS) conlleva un riesgo intrínseco de erosión de la privacidad debido a la naturaleza indiscriminada de la captura nucleotídica. Durante el procesamiento de una muestra de sangre o líquido cefalorraquídeo para la detección de sepsis, la totalidad de los polímeros de ADN y ARN son transducidos en señales iónicas, lo que incluye inevitablemente fragmentos genómicos del hospedador humano. Aunque se empleen técnicas de depleción selectiva de ADN humano mediante lisis diferencial y tratamiento con nucleasas, la sensibilidad extrema de los biosensores de nanoporos capaces de detectar una sola molécula captura trazas nucleotídicas que actúan como una "huella dactilar genómica" inalienable (Nielsen et al., 2025).

Tal como postulan (Goktas & Grzybowski, 2025), el riesgo de re-identificación del paciente a partir de metadatos genómicos depositados en repositorios abiertos como el European Nucleotide Archive (ENA) constituye una vulnerabilidad sistémica. Aunque los archivos se sometan a protocolos de "de-identificación digital", la persistencia de variantes estructurales y polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en las lecturas crudas permite, mediante algoritmos de inferencia genealógica, vincular una muestra clínica con la identidad civil del sujeto. Para mitigar esta claudicación de la privacidad, se propone la implementación de arquitecturas de Aprendizaje Federado (Federated Learning). Según detallan (Goktas & Grzybowski, 2025) y (Kardjadj, 2025), este modelo permite entrenar los algoritmos de

detección autónoma directamente en los servidores locales del hospital, evitando la migración de datos nucleotídicos crudos hacia la nube y garantizando el cumplimiento estricto del Reglamento General de Protección de Datos (GDPR) y el EU AI Act (Nielsen et al., 2025).

Además, la relevancia ética de la privacidad en metagenómica se extiende al fenómeno de la discriminación genómica. (Y. Zhao et al., 2024) advierten que el hallazgo incidental de variantes de riesgo para enfermedades crónicas o predisposiciones oncológicas durante un estudio de sepsis podría derivar en perjuicios socioeconómicos para el paciente si dicha información se filtra a aseguradoras o empleadores. La preservación de la integridad del paciente en la era del Big Data exige, por tanto, una "bioseguridad informática" que trate la información genómica con el mismo rigor que un santuario biológico, asegurando que la medicina de precisión no se convierta en una herramienta de exclusión sistémica (Goktas & Grzybowski, 2025).

12.2. Propiedad intelectual de secuencias genómicas y patentes de algoritmos

La comercialización de la inteligencia biológica ha generado una tensión dialéctica entre la protección de la innovación y el acceso universal a la salud. En la frontera de la metagenómica, la controversia se divide en dos ejes, la titularidad de las secuencias de patógenos y la propiedad intelectual (IP) sobre los algoritmos de diagnóstico autónomo. Como bien exponen (Struelens et al., 2024) y (Meslier et al., 2022), el concepto de "Soberanía Viral" derivado del Protocolo de Nagoya sugiere que los estados tienen derechos soberanos sobre los recursos genéticos de los microorganismos detectados en su territorio. No obstante, este acaparamiento de datos genómicos (*data hoarding*) choca con los principios FAIR (*Findable, Accessible, Interoperable, Reusable*), los cuales son el motor de la respuesta rápida ante pandemias (Struelens et al., 2024).

La mecánica operativa de las patentes en el diagnóstico genómico se observa en las solicitudes de patentes asociadas a flujos de trabajo específicos de detección. Tal como señalan (Nielsen et al., 2025), los equipos de investigación clínica a menudo se encuentran en procesos de patentar métodos para el diagnóstico de infecciones del torrente sanguíneo mediante cfDNA de nanoporos. Sin embargo, la patentabilidad de las secuencias de ADN *per se* ha sido restringida judicialmente, desplazando el foco del IP hacia los modelos de aprendizaje profundo (Deep Learning) que realizan el llamado de variantes y la predicción de resistencia. Según analizan y (Manzoor et al., 2025), el uso de bases de datos curadas como CARD para entrenar algoritmos de predicción de la Concentración Inhibitoria Mínima (CMI) *in silico*

plantea el reto de quién posee la autoría del descubrimiento: ¿el curador de la base de datos abierta o el desarrollador del modelo propietario? (Nielsen et al., 2025).

Tabla 13

Propiedad intelectual de secuencias genómicas y patentes de algoritmos

Elemento	Descripción	Problema o desafío	Consideración en metagenómica clínica
Secuencias genómicas	Información correspondiente al material genético obtenido mediante secuenciación.	Determinar qué aspectos pueden recibir protección jurídica y bajo qué condiciones.	Debe diferenciarse la información biológica de las aplicaciones o procedimientos técnicos desarrollados sobre ella.
Datos metagenómicos	Conjunto de secuencias obtenidas de una muestra que puede contener múltiples organismos.	Pueden involucrar información clínica, biológica y potencialmente identificable.	Requieren medidas de gobernanza, seguridad y uso responsable.
Métodos de secuenciación	Procedimientos técnicos empleados para obtener las secuencias.	Pueden involucrar tecnologías patentadas.	Es necesario identificar derechos y licencias aplicables antes de desarrollar determinadas aplicaciones.
Algoritmos de basecalling	Herramientas que convierten señales del nanoporo en secuencias de nucleótidos.	Pueden formar parte de tecnologías protegidas o desarrollos propietarios.	Su utilización puede estar condicionada por licencias o derechos sobre software y métodos.
Algoritmos de clasificación	Sistemas utilizados para identificar taxonómicamente las lecturas.	Existe una combinación entre algoritmos, bases de datos y software.	La propiedad puede distribuirse entre diferentes componentes tecnológicos.
Corrección de errores	Algoritmos destinados a mejorar la precisión de las lecturas.	Determinar la novedad y aplicabilidad de una solución computacional.	Puede generar desarrollos susceptibles de protección según la legislación aplicable.
Inteligencia artificial	Modelos utilizados para interpretar señales, clasificar microorganismos o predecir características genómicas.	Surgen interrogantes sobre titularidad, entrenamiento y utilización de modelos.	Deben definirse derechos sobre modelos, datos de entrenamiento y resultados generados.
Bases de datos genómicas	Colecciones organizadas de secuencias y anotaciones.	Pueden estar sujetas a derechos sobre compilación, estructura o acceso.	Es necesario respetar las condiciones de uso y licenciamiento.
Software bioinformático	Programas utilizados para procesar e interpretar datos de secuenciación.	Puede existir protección mediante derechos de autor, licencias u otros mecanismos.	La licencia determina las condiciones de uso, modificación y distribución.
Patentes de algoritmos	Protección de determinadas soluciones computacionales cuando cumplen los requisitos jurídicos correspondientes.	La patentabilidad de software y algoritmos varía según la jurisdicción y requiere analizar el carácter técnico de la invención.	No debe asumirse que cualquier algoritmo puede patentarse automáticamente.
Propiedad institucional	Derechos derivados de investigaciones realizadas en universidades, hospitales o empresas.	Pueden surgir disputas sobre quién posee los resultados.	Los contratos de investigación deben establecer claramente titularidad y explotación.

Colaboración científica	Participación de múltiples investigadores e instituciones.	Puede dificultar la determinación de derechos sobre resultados compartidos.	Es recomendable definir responsabilidades y propiedad antes del desarrollo del proyecto.
Publicación científica	Difusión de resultados mediante artículos, repositorios o bases de datos.	La publicación previa puede afectar determinadas estrategias de protección industrial.	Debe coordinarse la publicación con la estrategia de propiedad intelectual.
Datos de pacientes	Información genética asociada con muestras clínicas.	Existe riesgo de identificación y uso no autorizado.	Debe priorizarse la privacidad y la protección de datos, independientemente de la propiedad intelectual.
Acceso abierto	Disponibilidad pública de datos, métodos o software.	Puede entrar en tensión con modelos de explotación comercial.	Las licencias abiertas pueden facilitar la reproducibilidad y colaboración científica.
Interés público	Utilidad de los datos para diagnóstico, vigilancia y salud pública.	Una protección excesivamente restrictiva podría dificultar el acceso científico.	La innovación debe equilibrarse con las necesidades de investigación y salud pública.

Nota: Elaboración propia a partir de (Govender et al., 2025),

La propiedad intelectual relacionada con las secuencias genómicas y los algoritmos en el ámbito de la metagenómica clínica genera un contexto donde se conectan la información biológica, la innovación técnica y los derechos legales. Al crear una plataforma para la secuenciación, no solo se obtienen datos genéticos, sino que también se desarrollan algoritmos, bases de datos, métodos analíticos y herramientas de inteligencia artificial, cada uno con su propio valor y formas de protección.

Por lo tanto, es fundamental diferenciar entre la secuencia genética extraída de una muestra y los procedimientos técnicos y computacionales empleados para obtenerla, procesarla o interpretarla. Esta distinción es particularmente importante en proyectos de diagnóstico molecular directo, donde los datos pueden provenir de pacientes, lo que significa que las políticas de propiedad intelectual deben coexistir con las responsabilidades de privacidad, consentimiento y salvaguarda de la información genética.

Además, cuando universidades, hospitales y empresas trabajan juntos en el desarrollo de una tecnología, es fundamental establecer previamente quién posee los derechos sobre los algoritmos, bases de datos, métodos y resultados, así como las condiciones para su publicación y utilización. Desde una perspectiva científica, también es crucial promover mecanismos que permitan la reproducibilidad, la colaboración y el acceso responsable a los datos, evitando que la protección comercial se convierta en un impedimento innecesario para la investigación.

Desde la perspectiva de la gobernanza global, (Kardjadj, 2025) y (Goktas & Grzybowski, 2025) argumentan que la opacidad de los algoritmos denominada el efecto de la

"caja negra" dificulta la rendición de cuentas en caso de errores diagnósticos catastróficos. La regulación europea actual, a través del EU AI Act, exige que los sistemas de IA utilizados en la práctica clínica sean transparentes y auditables. Esta orquestación legal busca evitar la formación de "monopolios de datos" que inhiban la competencia científica y el desarrollo de diagnósticos asequibles en regiones de infraestructura limitada. En última instancia, la propiedad intelectual debe ser armonizada con la responsabilidad ética, asegurando que la innovación biotecnológica sea un bien común que potencie la seguridad sanitaria global sin comprometer la equidad en el acceso a la medicina genómica (Struelens et al., 2024).

12.2.1. Consentimiento informado para el análisis agnóstico de patógenos y variantes humanas

El modelo clásico de consentimiento informado, diseñado para intervenciones con dianas terapéuticas o diagnósticas específicas, resulta insuficiente ante la naturaleza exploratoria de la metagenómica shotgun. En el paciente con sepsis o choque séptico, la urgencia vital y la frecuencia de la alteración del sensorio medida por el score qSOFA o Glasgow impiden a menudo la obtención de un consentimiento previo y plenamente consciente. Como bien analizan (D. Lu et al., 2025) en su validación del sistema TriVerity, es imperativo el uso de protocolos de consentimiento diferido (by proxy) o procedimientos de exclusión voluntaria (*opt-out*) para permitir la captura de muestras biológicas en la fase hiper-aguda de la infección, donde la señal genómica es más potente (D. Lu et al., 2025).

La mecánica ética del consentimiento en metagenómica se ve complicada por el carácter agnóstico de la prueba. Al interrogar el paisaje molecular total, el médico puede descubrir accidentalmente variantes genéticas del hospedador relacionadas con trastornos hereditarios, lo que se denomina hallazgos secundarios o incidentales. Según postulan (Fortas et al., 2025) y (Meslier et al., 2022), el clínico tiene la obligación deontológica de informar al paciente sobre la posibilidad de estos hallazgos antes de la secuenciación. Esto exige una reingeniería del diálogo médico-paciente, donde se debe decidir previamente si el individuo desea que se le comuniquen resultados no relacionados con el episodio infeccioso actual. La relevancia clínica de esta "ética del retorno de resultados" (RoR) reside en la prevención de la ansiedad iatrogénica y en el respeto a la libertad del paciente de "no saber" sobre su propio destino genómico (Goktas & Grzybowski, 2025).

Asimismo, la bioinformática clínica impone una supervisión doctoral estricta sobre el diagnóstico autónomo. Como argumentan (Goktas & Grzybowski, 2025) y (Kardjadj, 2025),

el consentimiento no debe ser solo para la extracción de datos, sino para la delegación de la interpretación diagnóstica a una IA. Es necesario que el paciente o su representante legal comprenda que el informe final es el resultado de un filtrado algorítmico que, aunque altamente preciso, no está exento de sesgos de entrenamiento. La implementación de una IA explicable (XAI), que proporcione métricas de confianza transparentes para cada taxón identificado, es el requisito sine qua non para que el consentimiento informado trascienda el mero formalismo legal y se convierta en una protección real de la dignidad humana en el entorno de los cuidados críticos (Goktas & Grzybowski, 2025).

En conclusión, la bioética del Big Data genómico representa la frontera final de la medicina de precisión en enfermedades infecciosas. Al abordar el riesgo de identificación del huésped mediante arquitecturas federadas, regular la propiedad intelectual para fomentar la ciencia abierta y redefinir el consentimiento informado ante el diagnóstico agnóstico, esta disciplina garantiza que la inteligencia biológica se traduzca en una preservación de la vida humana bajo principios de justicia y autonomía. El desafío futuro reside en la validación universal de marcos regulatorios globales que aseguren que cada bit de información nucleotídica sea gestionado con la máxima excelencia científica y el más profundo respeto por la integridad biológica individual (Nielsen et al., 2025).

La integración de la metrología genómica de ultra-alta resolución con la computación avanzada ha inaugurado una era de inteligencia biológica ubicua, donde la capacidad de captura de información nucleotídica ha superado la velocidad de maduración de los marcos regulatorios y éticos tradicionales. Como bien argumentan (Goktas & Grzybowski, 2025) y (Kardjadj, 2025), la transición hacia un modelo de diagnóstico agnóstico que interroga la totalidad de la biomasa molecular en fluidos estériles no es solo una evolución técnica, sino un desafío epistemológico que exige una redefinición de la autonomía individual y la seguridad colectiva. En este contexto, la bioética del Big Data genómico actúa como el árbitro necesario para garantizar que la innovación tecnológica no claudique ante riesgos de discriminación o vulnerabilidades sistémicas en la protección de datos (Struelens et al., 2024).

12.3. Sesgos en la IA diagnóstica

La arquitectura de los modelos de aprendizaje profundo (Deep Learning) aplicados a la neuro-metagenómica y la sepsis es intrínsecamente vulnerable a la deriva algorítmica, un fenómeno donde la precisión diagnóstica se degrada cuando el sistema se enfrenta a perfiles genómicos que no fueron representados adecuadamente en la fase de entrenamiento. Como

analizan (Goktas & Grzybowski, 2025), la existencia de un sesgo de infradiagnóstico en poblaciones minoritarias es a menudo el resultado de utilizar bases de datos de referencia dominadas por genotipos europeos y patógenos prevalentes en el hemisferio norte. Esta claudicación de la equidad no es un fallo accidental, sino una consecuencia de la arquitectura de pesos sinápticos de la IA, que optimiza la pérdida (loss function) sobre la mayoría estadística, sacrificando la sensibilidad en los "bordes" de la diversidad biológica (Goktas & Grzybowski, 2025).

La mecánica para mitigar estos sesgos exige la implementación de lo que (Goktas & Grzybowski, 2025) denominan el "Regulatory Genome" (Genoma Regulatorio), un marco de supervisión adaptativo que impone auditorías de equidad algorítmica en cada etapa del ciclo de vida del producto. Fisiopatológicamente, un sesgo en la identificación taxonómica por ejemplo, una asignación errónea de una variante rara de *Klebsiella* debido a la homología con cepas comunes puede derivar en un ajuste inapropiado del tratamiento antimicrobiano, exacerbando la mortalidad en grupos vulnerables. Tal como postulan (Haghighat et al., 2024) y (Meslier et al., 2022), la orquestación bioinformática debe integrar técnicas de balanceo de datos y limpieza de señales (data cleaning) para asegurar que el llamado de variantes (variant calling) sea independiente de la procedencia étnica o geográfica del hospedador, transformando la IA de una "caja negra" sesgada en una herramienta de precisión universal (Goktas & Grzybowski, 2025).

Además, la relevancia clínica de asegurar la representatividad en los datasets se manifiesta en la predicción del resistoma. Según el análisis de (Alcock et al., 2023) y (Manzoor et al., 2025), el uso de la Antibiotic Resistance Ontology (ARO) permite normalizar las etiquetas de entrenamiento, reduciendo la ambigüedad semántica que a menudo induce sesgos en la interpretación de los mecanismos de resistencia. La equidad diagnóstica requiere, por tanto, que los modelos sean validados en cohortes externas que reflejen la variabilidad real de las unidades de cuidados intensivos a nivel global, asegurando que la métrica de confianza (confidence score) proporcionada por la IA sea una representación fidedigna de la realidad biológica y no un artefacto de un entrenamiento parroquial (Manzoor et al., 2025).

12.4. Seguridad de los datos genómicos frente a ciberataques y bioterrorismo

La naturaleza inalienable y digitalizable del metagenoma humano y microbiano convierte a los repositorios de datos hospitalarios en objetivos de alto valor estratégico para la ciberdelincuencia y el bioterrorismo. A diferencia de las credenciales bancarias, la información

genómica no puede ser modificada tras una filtración, lo que expone al paciente a una vulnerabilidad perpetua. Como bien señalan (Goktas & Grzybowski, 2025), los ciberataques en salud, como el phishing asistido por IA o el ransomware, no solo comprometen la privacidad, sino que pueden alterar la integridad de los resultados diagnósticos mediante ataques adversarios (adversarial attacks). Estos ataques consisten en la introducción de perturbaciones moleculares digitales modificaciones mínimas en los archivos FASTQ que inducen a la IA a realizar diagnósticos falsos positivos o a omitir patógenos letales, precipitando decisiones clínicas iatrogénicas (Goktas & Grzybowski, 2025).

La mecánica biofísica de la protección de datos en la era de los nanoporos se apoya en el Aprendizaje Federado (Federated Learning) y el cifrado homomórfico. Tal como analizan (Goktas & Grzybowski, 2025), estas arquitecturas permiten que los algoritmos de detección de brotes aprendan de los datos distribuidos en múltiples hospitales sin que la información nucleotídica cruda abandone nunca el cortafuegos de la institución de origen. Esta "soberanía de los datos" es vital para prevenir que actores malintencionados utilicen el mapeo de la virulencia y el resistoma de una unidad de quemados para diseñar estrategias de agresión biológica focalizada. La seguridad biometrológica exige, por tanto, una trazabilidad absoluta de la señal iónica desde el poro hasta el informe final, garantizando que cada bit de información genómica sea inmune a la manipulación externa (Goktas & Grzybowski, 2025).

Desde la perspectiva de la seguridad nacional, la vigilancia genómica global como la descrita por (Romero-Cabrera et al., 2022) es la herramienta centinela para identificar la liberación intencionada de patógenos modificados mediante ingeniería genómica. La mNGS agnóstica permite detectar firmas sintéticas y elementos genéticos móviles inusuales que actúan como "códigos de barras" de biomasas creadas en laboratorio. Según argumentan (Struelens et al., 2024), la cooperación internacional en el intercambio de datos abiertos bajo principios FAIR es el único mecanismo capaz de neutralizar una amenaza pandémica artificial en sus etapas prodrómicas, transformando la ciberseguridad informática en una forma avanzada de biodefensa proactiva que salvaguarda la integridad de la biosfera global (Struelens et al., 2024).

12.5. El diagnóstico autónomo

El debate sobre la autonomía diagnóstica de la inteligencia artificial frente al juicio clínico doctoral se halla en un punto de inflexión. La capacidad de los algoritmos de IA para procesar terabytes de datos multi-ómicos genómica, transcriptómica del hospedador y

proteómica supera con creces la latencia cognitiva humana. Como bien exponen (Goktas & Grzybowski, 2025), la medicina de alto rendimiento no busca la sustitución del facultativo, sino la convergencia simbiótica donde la IA actúa como un "copiloto biológico" que filtra el ruido genómico y jerarquiza las prioridades terapéuticas basándose en probabilidades estadísticas de éxito (Goktas & Grzybowski, 2025).

La mecánica analítica de esta transición se fundamenta en la IA Explicable (XAI). Según el análisis de (Haghighy et al., 2024), la principal barrera para el diagnóstico autónomo es la opacidad de los modelos de "caja negra". Para que un infectólogo acepte la recomendación de una IA sobre la interrupción de un tratamiento empírico en un choque séptico, el algoritmo debe proporcionar una trazabilidad del razonamiento clínico, mapas de calor sobre qué fragmentos nucleotídicos fueron decisivos, puntuaciones de confianza basadas en la profundidad de cobertura y la correlación con biomarcadores del hospedador como las 29 firmas de mRNA del sistema TriVerity. Esta transparencia técnica es la que permite que el criterio humano se eleve hacia la supervisión de sistemas complejos, delegando las tareas de metrología repetitiva a la máquina (Goktas & Grzybowski, 2025).

La relevancia de este modelo reside en la mitigación del error humano derivado de la fatiga o el sesgo cognitivo. Tal como señalan (Ratten et al., 2021) y (Y. Zhao et al., 2024), los errores diagnósticos son una de las principales causas de mortalidad evitable; la IA diagnóstica autónoma, integrada en la Historia Clínica Electrónica, puede actuar como una red de seguridad que alerte sobre etiologías inusuales como una encefalitis por virus neurotrópicos emergentes que el clínico podría omitir por un sesgo de disponibilidad. No obstante, la responsabilidad deontológica y legal permanece inalienable al ser humano. El futuro del diagnóstico autónomo se visualiza, por tanto, no como una sustitución jerárquica, sino como una potenciación de la inteligencia clínica, donde la decisión final es una síntesis entre la intuición biológica del experto y la precisión probabilística del silicio (Goktas & Grzybowski, 2025).

12.5. El dilema de los hallazgos incidentales genéticos en el huésped

La secuenciación metagenómica shotgun de lectura larga aplicada a la microbiología clínica captura inevitablemente material genético del hospedador humano, lo que genera una encrucijada ética sobre la gestión de la información no infecciosa. Durante la búsqueda de un agente etiológico en una meningitis, el secuenciador puede identificar variantes estructurales o polimorfismos asociados a predisposiciones oncológicas, enfermedades neurodegenerativas o trastornos mendelianos. Como bien analizan (Kurnat-Thoma, 2024), este fenómeno de los

hallazgos secundarios o incidentales impone la necesidad de protocolos de Retorno de Resultados (RoR) que respeten la autonomía del paciente (Kurnat-Thoma, 2024).

La mecánica ética para resolver este dilema se apoya en el consentimiento informado dinámico y el derecho a no saber. Tal como postulan (Goktas & Grzybowski, 2025) y (Kurnat-Thoma, 2024), el clínico tiene la obligación doctoral de informar al paciente o a su representante legal en casos de sepsis con alteración del sensorio sobre la posibilidad de descubrir información genética incidental antes de proceder con la mNGS. El paciente debe poder decidir, de forma granular, si desea recibir información sobre variantes accionables (aquellas con intervenciones preventivas claras, según la lista ACMG SF v3.2) o si prefiere limitar el análisis exclusivamente al compartimento microbiano. Esta orquestación ética busca evitar la angustia iatrogénica y el riesgo de discriminación genómica, donde la información incidental podría ser utilizada por aseguradoras para penalizar al individuo (Goktas & Grzybowski, 2025).

Además, la relevancia clínica del manejo de hallazgos incidentales se extiende a la farmacogenómica (PGx). La detección incidental de polimorfismos en genes de metabolización de fármacos (como los del sistema CYP450) durante un estudio metagenómico puede ser vital para ajustar la dosificación de los antimicrobianos, transformando un riesgo incidental en un beneficio terapéutico directo. Por tanto, el dilema bioético no debe derivar en un bloqueo del análisis genómico del huésped, sino en una gobernanza de la información que sitúe al paciente en el centro de la decisión. En última instancia, la bioética del metagenoma exige un equilibrio entre la potencia diagnóstica de la tecnología y la preservación de la integridad biológica y social del ser humano en la era de la medicina genómica autónoma (Nielsen et al., 2025).

En conclusión, la bioética del Big Data genómico representa la culminación de la excelencia científica aplicada a la seguridad del paciente. Al abordar críticamente los sesgos algorítmicos, blindar los datos frente a amenazas cibernéticas, instaurar una IA explicable que potencie el criterio del infectólogo y gestionar con rigor los hallazgos incidentales, esta disciplina garantiza que la inteligencia biológica sea el motor de una medicina de precisión equitativa y humana. El desafío futuro reside en la validación universal de estos marcos éticos para que cada bit de información nucleotídica sea un catalizador para la vida bajo principios de justicia y autonomía absoluta (Nielsen et al., 2025).

La culminación de la medicina de precisión en el ámbito de las enfermedades infecciosas críticas no reside exclusivamente en la potencia analítica de los biosensores, sino

en la solidez ética y regulatoria que sustenta la gestión del flujo masivo de información biológica. El tránsito hacia el Laboratorio 4.0 representa un cambio ontológico, la metamorfosis del diagnóstico microbiológico, que abandona su dependencia de la viabilidad celular para convertirse en un ejercicio de metrología digital agnóstica. Como bien postulan (Goktas & Grzybowski, 2025), la integración de la inteligencia artificial (IA) y la secuenciación de molécula única impone una reingeniería de los marcos bioéticos, donde la preservación de la integridad del paciente debe armonizarse con la urgencia de la respuesta clínica en escenarios de sepsis y neuro-infecciones refractarias (Struelens et al., 2024).

12.5.1. Regulación internacional de los dispositivos de secuenciación de uso doméstico

La descentralización de la tecnología de secuenciación, catalizada por la miniaturización de dispositivos como el MinION y la emergencia de biosensores portátiles integrados en teléfonos inteligentes, ha borrado los límites entre el entorno hospitalario y el doméstico. Esta transición hacia lo que (Haghighat et al., 2024) denominan "diagnóstico ubicuo de punto de atención" plantea desafíos regulatorios sin precedentes. Históricamente, el diagnóstico molecular estaba confinado a centros certificados bajo normativas como las enmiendas CLIA en Estados Unidos o el reglamento IVDR en la Unión Europea. No obstante, la posibilidad de que individuos no especializados realicen una vigilancia molecular de su propio microbioma o detecten patógenos respiratorios en el hogar exige una supervisión doctoral estricta para evitar la iatrogenia informativa (Kardjadj, 2025).

La mecánica operativa de la regulación internacional debe centrarse en la validación de la validez clínica frente a la analítica. Según detallan (Kardjadj, 2025) y (Goktas & Grzybowski, 2025), los dispositivos de uso doméstico a menudo demuestran una precisión analítica robusta capacidad de identificar bases nitrogenadas con una exactitud Q20+, pero su utilidad clínica se ve comprometida por la falta de un contexto médico especializado. El riesgo de falsos positivos derivados del "kit-oma" (ADN contaminante en reactivos) o la interpretación errónea de la DNAemia basal puede inducir una automedicación peligrosa o una ansiedad diagnóstica sistémica. Por ello, marcos como el EU AI Act y el programa SaMD (Software as a Medical Device) de la FDA están evolucionando para exigir que los algoritmos de diagnóstico autónomo integrados en estos dispositivos sean transparentes, auditables y posean mecanismos de bloqueo ante señales biológicamente inverosímiles (Nielsen et al., 2025).

La relevancia clínica de esta regulación reside en la protección del ecosistema de salud pública. Como argumentan (Struelens et al., 2024) y (S. Casimiro-Soriguer et al., 2025), la proliferación de datos genómicos generados fuera de circuitos controlados podría contaminar las bases de datos de vigilancia epidemiológica con secuencias de baja calidad o mal etiquetadas. La gobernanza internacional debe garantizar que la secuenciación portátil cumpla con los principios FAIR (*Findable, Accessible, Interoperable, Reusable*), permitiendo que la información generada en el punto de necesidad se integre de forma segura y anónima en las redes de vigilancia global de la OMS. Esta orquestación técnica es la que permitirá que la innovación biotecnológica se traduzca en una verdadera democratización del acceso a la salud, asegurando que cada biosensor doméstico sea un nodo de inteligencia biológica supervisado por el rigor de la medicina institucional (Struelens et al., 2024).

12.5.2. Sostenibilidad del Laboratorio de Microbiología 4.0: Impacto ambiental del cómputo

La paradoja del Laboratorio de Microbiología 4.0 reside en su dependencia de infraestructuras de computación de alta intensidad que imponen una carga ecológica sustancial. El procesamiento de terabytes de datos nucleotídicos crudos (FASTQ) generados por secuenciadores de nanoporos exige una potencia de cómputo que deriva en un consumo energético masivo y en la generación de calor disipado, contribuyendo a la huella de carbono del sector sanitario. Como analizan (Goktas & Grzybowski, 2025) y (Kurnat-Thoma, 2024), el desarrollo de una IA para el diagnóstico genómico debe someterse a evaluaciones de impacto ambiental (*eco-impact assessments*) que garanticen la alineación con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (Goktas & Grzybowski, 2025).

La mecánica biofísica de la sostenibilidad en metagenómica se apoya en la eficiencia algorítmica y el uso del muestreo adaptativo (*adaptive sampling*). Tal como postulan (Marchukov et al., 2023) y (Agustinho et al., 2024), la capacidad de los nanoporos para realizar una deplesión digital en tiempo real donde el software rechaza hebras de ADN humano tras leer las primeras 400 bases reduce drásticamente la cantidad de datos innecesarios que deben ser procesados y almacenados. Esta "microscopía genómica selectiva" no solo incrementa la sensibilidad de detección de patógenos, sino que optimiza el uso de recursos computacionales, disminuyendo la energía requerida por las unidades de procesamiento gráfico (GPU) y los servidores en la nube. La relevancia doctoral de este enfoque es inmediata, la medicina de precisión solo es ética si es sostenible a largo plazo, evitando que el beneficio clínico individual comprometa la integridad climática global (Agustinho et al., 2024).

Además, la arquitectura informática del Laboratorio 4.0 está transitando hacia modelos de Computación de Borde (*Edge Computing*) y arquitecturas federadas. Según detallan (Kardjadj, 2025) y (Goktas & Grzybowski, 2025), el análisis de datos directamente en el punto de atención mediante dispositivos de bajo consumo integrados en el hardware de secuenciación minimiza la necesidad de transferencias masivas de datos hacia centros de cómputo remotos. Esta orquestación logística no solo protege la privacidad del paciente, al evitar la migración de archivos genómicos crudos, sino que reduce el impacto ambiental asociado a la infraestructura de telecomunicaciones. En última instancia, la sostenibilidad del diagnóstico genómico exige una síntesis entre la ingeniería biológica y la eficiencia energética, consolidando a la metagenómica como una disciplina consciente de su huella planetaria (Nielsen et al., 2025).

12.6. Visión 2030: De la secuencia al tratamiento en menos de sesenta minutos

El horizonte estratégico de la infectología crítica para el año 2030 se define por la eliminación de la latencia diagnóstica, alcanzando un intervalo de "tiempo-al-resultado" inferior a una hora. En la actualidad, los flujos de trabajo metagenómicos más veloces operan en ventanas de 3 a 6 horas; no obstante, la aceleración tecnológica proyectada por (Haghighy et al., 2024) y (Govender et al., 2025) sugiere que la integración de la microfluídica avanzada con algoritmos de IA de aprendizaje profundo permitirá una resolución etiológica casi instantánea (Govender et al., 2025).

La mecánica biofísica de esta visión se fundamenta en la transducción directa y el basecalling de alta velocidad. Según detallan (Van Dijk et al., 2023) y (Agustinho et al., 2024), el uso de poros R10.4.1 optimizados y una química de secuenciación de ultra-alto flujo facilita la generación de señales iónicas interpretables en milisegundos. Para el año 2030, se anticipa la maduración de biosensores basados en partículas de plasmón bioinspiradas (BPV) y espectroscopía Raman amplificada por superficie (SERS), capaces de detectar proteínas de espícula viral o determinantes de resistencia bacteriana directamente en el aire exhalado o en el fluido intersticial mediante parches de microagujas (Van Dijk et al., 2023). Esta capacidad de "interrogatorio molecular in vivo" permitiría que el inicio de la terapia dirigida ocurra antes de que se consume el primer ciclo de replicación del patógeno en el hospedador.

La relevancia clínica de este avance es particularmente crítica en el manejo de la meningitis bacteriana decapitada y el choque séptico fulminante. Como argumentan (Nielsen et al., 2025) y (D. Lu et al., 2025), la identificación del resistoma funcional en menos de sesenta minutos faculta al intensivista para realizar una desescalada o escalada terapéutica de precisión en el primer "momento de oro" de la reanimación. Al integrar la metrología del patógeno con

la respuesta transcriptómica del hospedador como las firmas de 29 mARN del sistema TriVerity evaluadas en 30 minutos, el diagnóstico autónomo podrá predecir la trayectoria del fallo orgánico con una certidumbre del 99%. Esta orquestación molecular es la que permitirá que la medicina intensiva trascienda la reacción sintomática para consolidarse como una disciplina de intervención biológica anticipatoria (Nielsen et al., 2025).

12.6. Controversias actuales, análisis crítico de la evidencia y perspectivas futuras

A pesar del optimismo tecnológico, la neuro-metagenómica y el diagnóstico autónomo se hallan inmersos en controversias epistemológicas que condicionan su validación sistémica. La controversia más incisiva se centra en el fenómeno del "kit-oma" y la adjudicación de causalidad. Como analizan (Albitar et al., 2023) y (Nielsen et al., 2025), la extrema sensibilidad de los secuenciadores de nanoporos captura fragmentos nucleotídicos omnipresentes en el entorno clínico, lo que genera el riesgo de falsos diagnósticos. El análisis crítico de la evidencia sugiere que la positividad metagenómica solo debe interpretarse bajo el rigor doctoral de umbrales cuantitativos estrictos (GPM/RPM) y la concordancia con la clínica, evitando que la tecnología opaque el juicio médico tradicional (Nielsen et al., 2025).

Otra área de debate fundamental es la opacidad de los modelos de inteligencia artificial aplicados al llamado de variantes y la predicción de resistencia. (Goktas & Grzybowski, 2025) y (Kardjadj, 2025) advierten sobre el riesgo de las "cajas negras", donde las decisiones terapéuticas se basan en puntuaciones de confianza cuya lógica interna es inaccesible para el clínico. Es imperativo transitar hacia una IA Explicable (XAI) que proporcione una trazabilidad absoluta, permitiendo que el facultativo valide la plausibilidad biológica del hallazgo. Asimismo, la controversia sobre la "Soberanía Viral" frente al intercambio de datos abiertos planteada por (Kurnat-Thoma, 2024) exige marcos de gobernanza que protejan los derechos de los países en desarrollo sin obstaculizar la preparación pandémica global (Struelens et al., 2024).

Las perspectivas futuras se vislumbran en la convergencia de la metagenómica con la proteómica de nanoporos y los gemelos digitales. (Van Dijk et al., 2023) y (Haghayegh et al., 2024) anticipan el desarrollo de sistemas que no solo secuencien ADN/ARN, sino que cuantifiquen modificaciones postraduccionales en tiempo real, permitiendo una monitorización multimodal de la infección. La creación de "gemelos biológicos digitales" del paciente permitirá simular la respuesta a diferentes regímenes antimicrobianos antes de su administración real, minimizando la toxicidad y maximizando la supervivencia. En última

instancia, el desafío futuro reside en la validación universal de estos modelos para asegurar que la inteligencia biológica autónoma sea un motor de equidad, seguridad y excelencia científica en la infectología del siglo XXI (Van Dijk et al., 2023).

En conclusión, la bioética del Big Data genómico y la evolución hacia el diagnóstico autónomo representan el cenit de la ingeniería diagnóstica. Al regular la secuenciación doméstica, priorizar la sostenibilidad ambiental del cómputo, proyectar una rapidez diagnóstica sub-horaria para el año 2030 y abordar críticamente los desafíos éticos de la IA, esta disciplina dota al sistema de salud de una inteligencia biológica total e irreprochable. El éxito de esta transición dependerá de la capacidad de la clase médica para liderar la supervisión de estas tecnologías, garantizando que cada bit de información genómica se traduzca en una vida salvada bajo los principios de justicia, autonomía y preservación de la dignidad humana (Nielsen et al., 2025).

Referencias Bibliografía

- Adusumalli, R. (2022). Biomarkers for early diagnosis and management of cardiovascular diseases. *Advances in Bioscience and Clinical Medicine*, 10(1), 16-20. <https://doi.org/10.7575/aiac.abcmmed.v.10n.1p.16>
- Agustinho, D. P., Fu, Y., Menon, V. K., Metcalf, G. A., Treangen, T. J., & Sedlazeck, F. J. (2024). Unveiling microbial diversity: Harnessing long-read sequencing technology. *Nature Methods*, 21(6), 954-966. <https://doi.org/10.1038/s41592-024-02262-1>
- Ahannach, S., Delanghe, L., Spacova, I., Wittouck, S., Van Beeck, W., De Boeck, I., & Lebeer, S. (2021). Microbial enrichment and storage for metagenomics of vaginal, skin, and saliva samples. *iScience*, 24(11), 103306. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103306>
- Albitar, M., Zhang, H., Charifa, A., Ip, A., Ma, W., McCloskey, J., Donato, M., Siegel, D., Waintraub, S., Gutierrez, M., Pecora, A., & Goy, A. (2023). Combining cell-free RNA with cell-free DNA in liquid biopsy for hematologic and solid tumors. *Heliyon*, 9(5), e16261. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16261>
- Alcock, B. P., Huynh, W., Chalil, R., Smith, K. W., Raphenya, A. R., Wlodarski, M. A., Edalatmand, A., Petkau, A., Syed, S. A., Tsang, K. K., Baker, S. J. C., Dave, M., McCarthy, M. C., Mukiri, K. M., Nasir, J. A., Golbon, B., Imtiaz, H., Jiang, X., Kaur, K., ... McArthur, A. G. (2023). CARD 2023: Expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D690-D699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac920>
- Antonopoulos, A. S., Angelopoulos, A., Papanikolaou, P., Simantiris, S., Oikonomou, E. K., Vamvakaris, K., Koumpoura, A., Farmaki, M., Trivella, M., Vlachopoulos, C., Tsioufis, K., Antoniadis, C., & Tousoulis, D. (2022). Biomarkers of Vascular Inflammation for Cardiovascular Risk Prognostication. *JACC: Cardiovascular Imaging*, 15(3), 460-471. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2021.09.014>
- Ardila, C. M., Jiménez-Arbeláez, G. A., & Vivares-Builes, A. M. (2023). The Potential Clinical Applications of a Microfluidic Lab-on-a-Chip for the Identification and Antibiotic Susceptibility Testing of *Enterococcus faecalis*-Associated Endodontic Infections: A Systematic Review. *Dentistry Journal*, 12(1), 5. <https://doi.org/10.3390/dj12010005>

- Baek, J.-C., Jo, H.-C., Lee, S.-M., Park, J.-E., Cho, I.-A., & Sung, J.-H. (2021). Prevalence of Pathogens and Other Microorganisms in Premenopausal and Postmenopausal Women with Vulvovaginal Symptoms: A Retrospective Study in a Single Institute in South Korea. *Medicina*, 57(6), 577. <https://doi.org/10.3390/medicina57060577>
- Bakir, A., Cendek, B. D., Usluca, S., Aral, M., Korkut, G., Morkoc, M., Yagiz, G. C., Kurkcü, M. F., Sapmaz, M. A., Polat, M., Erbey, S., Ozturk, B. G., & Keskin, H. L. (2025). Detection of sexually transmitted infection agents in pregnant women using multiplex polymerase chain reaction method. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 25(1), 307. <https://doi.org/10.1186/s12884-025-07430-5>
- Bavaro, D. F., De Gennaro, N., Belati, A., Diella, L., Papagni, R., Frallonardo, L., Camporeale, M., Guido, G., Pellegrino, C., Marrone, M., Dell'Erba, A., Gesualdo, L., Brienza, N., Grasso, S., Columbo, G., Moschetta, A., Carpagnano, G. E., Daleno, A., Minicucci, A. M., ... Saracino, A. (2023). Impact of a Pro-Active Infectious Disease Consultation on the Management of a Multidrug-Resistant Organisms Outbreak in a COVID-19 Hospital: A Three-Months Quasi-Experimental Study. *Antibiotics*, 12(4), 712. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040712>
- Bélangier, N., Zeid, S., Velmeden, D., Schulz, A., Koeck, T., Rausch, F., Fooß, B., Kazemi-Asrar, F., Lackner, K. J., Gori, T., Münzel, T., Prochaska, J. H., Simon, P., & Wild, P. S. (2026). Cardiac vagal activity is associated with insulin metabolism in heart failure: Results from the Myovasc study. *Cardiovascular Diabetology*, 25(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s12933-025-03040-9>
- Benoit, P., Brazer, N., De Lorenzi-Tognon, M., Kelly, E., Servellita, V., Oseguera, M., Nguyen, J., Tang, J., Omura, C., Streithorst, J., Hillberg, M., Ingebrigtsen, D., Zorn, K., Wilson, M. R., Blicharz, T., Wong, A. P., O'Donovan, B., Murray, B., Miller, S., & Chiu, C. Y. (2024). Seven-year performance of a clinical metagenomic next-generation sequencing test for diagnosis of central nervous system infections. *Nature Medicine*, 30(12), 3522-3533. <https://doi.org/10.1038/s41591-024-03275-1>
- Chhay, P., Zhu, D., Tang, O., Gray, M. P., Vernon, S. T., Di Bartolo, B. A., Kott, K. A., Grieve, S. M., Gibson, R. A., Psaltis, P. J., & Figtree, G. A. (2026). Plasma fatty acid profiles and coronary artery disease burden assessed by coronary CT angiography: An observational study. *Scientific Reports*, 16(1), 6314. <https://doi.org/10.1038/s41598-026-36845-z>

- Ciaparrone, G., Pirone, D., Fiore, P., Xin, L., Xiao, W., Li, X., Bardozzo, F., Bianco, V., Miccio, L., Pan, F., Memmolo, P., Tagliaferri, R., & Ferraro, P. (2024). Label-free cell classification in holographic flow cytometry through an unbiased learning strategy. *Lab on a Chip*, 24(4), 924-932. <https://doi.org/10.1039/D3LC00385J>
- Coll, F., Gouliouris, T., Blane, B., Yeats, C. A., Raven, K. E., Ludden, C., Khokhar, F. A., Wilson, H. J., Roberts, L. W., Harrison, E. M., Horner, C. S., Le, T. H., Nguyen, T. H., Nguyen, V. T., Brown, N. M., Holmes, M. A., Parkhill, J., Estee Török, M., & Peacock, S. J. (2024). Antibiotic resistance determination using *Enterococcus faecium* whole-genome sequences: A diagnostic accuracy study using genotypic and phenotypic data. *The Lancet Microbe*, 5(2), e151-e163. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(23\)00297-5](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(23)00297-5)
- Denk-Lobnig, M., & Wood, K. B. (2023). Antibiotic resistance in bacterial communities. *Current Opinion in Microbiology*, 74, 102306. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102306>
- Elbehiry, A., Marzouk, E., & Abalkhail, A. (2025). Antimicrobial resistance at a turning point: Microbial drivers, one health, and global futures. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1698809. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1698809>
- Feijoó, V., Liseth, A., Velasco, Z., & Karina, E. (s. f.). *Aplicaciones de la inteligencia artificial en el diagnóstico médico basado en datos*.
- Florensa, A. F., Kaas, R. S., Clausen, P. T. L. C., Aytan-Aktug, D., & Aarestrup, F. M. (2022). ResFinder – an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. *Microbial Genomics*, 8(1). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000748>
- Fortas, C., Harimanana, A. N., Rasoanandrianina, S. B., Rasoanaivo, T. F., Razanadranaivo, H. L., Mangahasimbola, R. T., Rasolon, D. T., Rafetrarivony, L. F., Rasolofomanana, T. T., Rabarisoa, L., Huynh, B.-T., Randremanana, R. V., & Crucitti, T. (2025). Sexually transmitted infections and bacterial vaginosis in women of child-bearing age in Antananarivo, Madagascar: Prevalence and risk factors from a cross-sectional study. *BMC Infectious Diseases*, 25(1), 262. <https://doi.org/10.1186/s12879-025-10578-2>
- Goktas, P., & Grzybowski, A. (2025). Shaping the Future of Healthcare: Ethical Clinical Challenges and Pathways to Trustworthy AI. *Journal of Clinical Medicine*, 14(5), 1605. <https://doi.org/10.3390/jcm14051605>

- Govender, K. N., Street, T. L., Sanderson, N. D., Leach, L., Morgan, M., & Eyre, D. W. (2025). *Rapid clinical diagnosis and treatment of common, undetected, and uncultivable bloodstream infections using metagenomic sequencing from routine blood cultures with Oxford Nanopore*. *Infectious Diseases (except HIV/AIDS)*. <https://doi.org/10.1101/2025.01.08.25320182>
- Guo, L., Luo, S., Shen, R., Yan, P., Wang, M., Zhang, T., Lv, J., Liu, G., Huang, H., Chen, Z., Wang, H., Peng, W., Wu, J., Chen, J., & Wang, R. (2025). Urinary and plasma donor-derived cell-free DNA for noninvasive monitoring of BK polyomavirus-associated nephropathy in kidney transplant recipients: A prospective cohort study. *Renal Failure*, 47(1), 2521452. <https://doi.org/10.1080/0886022X.2025.2521452>
- Haghighayegh, F., Norouziyazad, A., Haghani, E., Feygin, A. A., Rahimi, R. H., Ghavamabadi, H. A., Sadighbayan, D., Madhoun, F., Papagelis, M., Felfeli, T., & Salahandish, R. (2024). Revolutionary Point-of-Care Wearable Diagnostics for Early Disease Detection and Biomarker Discovery through Intelligent Technologies. *Advanced Science*, 11(36), 2400595. <https://doi.org/10.1002/advs.202400595>
- Hala, S., Malaikah, M., Huang, J., Bahitham, W., Fallatah, O., Zakri, S., Antony, C. P., Alshehri, M., Ghazzali, R. N., Ben-Rached, F., Alsaafi, A., Alsaedi, A., AlAhmadi, G., Kaaki, M., Alazmi, M., AlhajHussein, B., Yaseen, M., Zowawi, H. M., Alghoribi, M. F., ... Pain, A. (2024). The emergence of highly resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* CC14 clone in a tertiary hospital over 8 years. *Genome Medicine*, 16(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s13073-024-01332-5>
- Hao, J., Li, W., Wang, Y., Zhao, J., & Chen, Y. (2023). Clinical utility of metagenomic next-generation sequencing in pathogen detection for lower respiratory tract infections and impact on clinical outcomes in southernmost China. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1271952. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1271952>
- He, R.-R., Yue, G.-L., Dong, M.-L., Wang, J.-Q., & Cheng, C. (2024). Sepsis Biomarkers: Advancements and Clinical Applications—A Narrative Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(16), 9010. <https://doi.org/10.3390/ijms25169010>
- Huang, Y., Tutino, M., Singh, A., Rayner, N. W., Barysenka, A., Bocher, O., & Zeggini, E. (2026). Integration of clinical and proteomic risk factors enhances prognostic modelling of incident vascular complications in type 2 diabetes. *Cardiovascular Diabetology*, 25(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s12933-026-03083-6>

- Jia, H., Li, X., Zhuang, Y., Wu, Y., Shi, S., Sun, Q., He, F., Liang, S., Wang, J., Draz, M. S., Xie, X., Zhang, J., Yang, Q., & Ruan, Z. (2024). Neural network-based predictions of antimicrobial resistance phenotypes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* from whole genome sequencing and gene expression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 68(12), e01446-24. <https://doi.org/10.1128/aac.01446-24>
- Jiang, L., Jian, J., Sai, X., & Wu, X. (2025). Revealing VCAN as a Potential Common Diagnostic Biomarker of Renal Tubules and Glomerulus in Diabetic Kidney Disease Based on Machine Learning, Single-Cell Transcriptome Analysis and Mendelian Randomization. *Diabetes & Metabolism Journal*, 49(3), 407-420. <https://doi.org/10.4093/dmj.2024.0233>
- Jiang, S., Zhao, D., Wang, C., Liu, X., Yang, Q., Bao, X., Dong, T., Li, G., Gu, Y., Ye, Y., Sun, B., Xu, S., Zhou, X., Fan, L., & Tang, L. (2024). Clinical evaluation of droplet digital PCR in the early identification of suspected sepsis patients in the emergency department: A prospective observational study. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, 1358801. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1358801>
- Kardjadj, M. (2025). Advances in Point-of-Care Infectious Disease Diagnostics: Integration of Technologies, Validation, Artificial Intelligence, and Regulatory Oversight. *Diagnostics*, 15(22), 2845. <https://doi.org/10.3390/diagnostics15222845>
- Kumar, M., Murata, T., & Matoba, O. (2024). Live Cell Imaging by Single-Shot Common-Path Wide Field-of-View Reflective Digital Holographic Microscope. *Sensors*, 24(3), 720. <https://doi.org/10.3390/s24030720>
- Kurnat-Thoma, E. L. (2024). Patient safety and healthcare quality of U.S. laboratory developed tests (LDTs) in the AI/ML era of precision medicine. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 11, 1407513. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2024.1407513>
- Liborio, M. P., Harris, P. N. A., Ravi, C., & Irwin, A. D. (2024). Getting Up to Speed: Rapid Pathogen and Antimicrobial Resistance Diagnostics in Sepsis. *Microorganisms*, 12(9), 1824. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12091824>
- Liu, Y., Wang, Z., Jian, Z., Liu, P., Li, Y., Qin, F., Yan, Q., & Liu, W. (2025). Nosocomial transmission, adaption and clinical outcomes of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Microbiology*, 25(1), 376. <https://doi.org/10.1186/s12866-025-04096-z>

- Lu, D., Kalantar, K. L., Glascock, A. L., Chu, V. T., Guerrero, E. S., Bernick, N., Butcher, X., Ewing, K., Fahsbender, E., Holmes, O., Hoops, E., Jones, A. E., Lim, R., McCanny, S., Reynoso, L., Rosario, K., Tang, J., Valenzuela, O., Mourani, P. M., ... Langelier, C. R. (2025). Simultaneous detection of pathogens and antimicrobial resistance genes with the open source, cloud-based, CZ ID platform. *Genome Medicine*, 17(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s13073-025-01480-2>
- Lu, J., Ter Voert, M. A., Ünal, M., Whitfield, N. N., Liesenfeld, O., Ter Maaten, J. C., Sweeney, T. E., & Bouma, H. R. (2025). Early sepsis recognition: A pilot study using a rapid high-multiplex host-response mRNA diagnostic test. *Intensive Care Medicine Experimental*, 13(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s40635-025-00735-x>
- Lu, Z., Ni, W., Wu, Y., Zhai, B., Zhao, Q., Zheng, T., Liu, Q., & Ding, D. (2025). Application of biomarkers in the diagnosis of kidney disease. *Frontiers in Medicine*, 12, 1560222. <https://doi.org/10.3389/fmed.2025.1560222>
- Manzoor, H., Li, H., & Kayani, M. U. R. (2025). Identification of antibiotic resistance genes from whole genome and metagenome sequencing datasets. *One Health Advances*, 3(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s44280-025-00079-x>
- Marchukov, D., Li, J., Juillerat, P., Misselwitz, B., & Yilmaz, B. (2023). Benchmarking microbial DNA enrichment protocols from human intestinal biopsies. *Frontiers in Genetics*, 14, 1184473. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1184473>
- Martin-Loeches, I., David, S., Pène, F., Kreitmann, L., Russell, L., Puxty, K., Silva, J. S., Mata, A. V., Creagh-Brown, B., Castro, P., Salluh, J., Vidaur-Tello, L., Nseir, S., & Azoulay, E. (2025). Advocating for the recognition of underlying immunosuppression in critical illness. *eClinicalMedicine*, 85, 103300. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2025.103300>
- Maugeri, G., Calvo, M., Bongiorno, D., Bivona, D., Migliorisi, G., Privitera, G. F., Scalia, G., & Stefani, S. (2025). Sequencing Analysis of Invasive Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates Secondary to Gastrointestinal Colonization. *Microorganisms*, 13(1), 89. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13010089>
- Meng, B., Liu, H., Wu, Q., Qu, L., Mao, C., Yang, F., Lan, T., Fang, J., Hu, Z., & Fang, Y. (2025). Antimicrobial strategies of lower respiratory tract infections in immunocompromised patients based on metagenomic next-generation sequencing: A retrospective study. *BMC Infectious Diseases*, 25(1), 360. <https://doi.org/10.1186/s12879-025-10753-5>

- Meslier, V., Quinquis, B., Da Silva, K., Plaza Oñate, F., Pons, N., Roume, H., Podar, M., & Almeida, M. (2022). Benchmarking second and third-generation sequencing platforms for microbial metagenomics. *Scientific Data*, 9(1), 694. <https://doi.org/10.1038/s41597-022-01762-z>
- Milburn, J., Suresh, R., Doyle, R., & Jarvis, J. N. (2024). The diagnosis of central nervous system infections in resource-limited settings and the use of novel and molecular diagnostic platforms to improve diagnosis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 24(3), 219-230. <https://doi.org/10.1080/14737159.2024.2317414>
- Nasrollahian, S., Graham, J. P., & Halaji, M. (2024). A review of the mechanisms that confer antibiotic resistance in pathotypes of *E. coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, 1387497. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1387497>
- Nemati, M. A., & Sadat, S. M. (2025). Pathophysiology, Diagnosis and Prevention of Subclinical Atherosclerosis: A Narrative Review. *Salamat Academic & Research Journal*, 2(3), 61-72. <https://doi.org/10.61438/sarj.v2i3.193>
- Nielsen, M. E., Sogaard, K. K., Karst, S. M., Krarup, A. L., Albertsen, M., & Nielsen, H. L. (2025). Application of rapid Nanopore metagenomic cell-free DNA sequencing to diagnose bloodstream infections: A prospective observational study. *Microbiology Spectrum*, 13(5), e03295-24. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03295-24>
- Olie, S. E., Andersen, C. Ø., Van De Beek, D., & Brouwer, M. C. (2024). Molecular diagnostics in cerebrospinal fluid for the diagnosis of central nervous system infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 37(4), e00021-24. <https://doi.org/10.1128/cmr.00021-24>
- Parhofer, K. G., Pittrow, D., Birkenfeld, A. L., Fraass, U., Hohenstein, B., Siegert, C., Klotsche, J., Steinhagen-Thiessen, E., Dexe, S., Schettler, V. J. J., & Laufs, U. (2026). Treatment persistence, lipid lowering, and 3-year clinical outcomes in patients at very high cardiovascular risk on PCSK9 monoclonal antibodies. *Clinical Research in Cardiology*, 115(2), 288-303. <https://doi.org/10.1007/s00392-025-02719-z>
- Park, S., You, Y.-A., Lee, G., Hur, Y. M., Go, Y.-Y., Park, S., & Kim, Y. J. (2025). Vaginal microbiome and its implications in preterm birth. *Obstetrics & Gynecology Science*, 68(6), 449-457. <https://doi.org/10.5468/ogs.25085>
- Payne, M., Hu, D., Wang, Q., Sullivan, G., Graham, R. M., Rathnayake, I. U., Jennison, A. V., Sintchenko, V., & Lan, R. (2024). DODGE: Automated point source bacterial outbreak

- detection using cumulative long term genomic surveillance. *Bioinformatics*, 40(7), btae427. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btae427>
- Peri, A. M., Chatfield, M. D., Ling, W., Furuya-Kanamori, L., Harris, P. N. A., & Paterson, D. L. (2024). Rapid Diagnostic Tests and Antimicrobial Stewardship Programs for the Management of Bloodstream Infection: What Is Their Relative Contribution to Improving Clinical Outcomes? A Systematic Review and Network Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 79(2), 502-515. <https://doi.org/10.1093/cid/ciae234>
- Pinzauti, D., Biazzo, M., Podrini, C., Alevizou, A., Safarika, A., Damoraki, G., Koufargyris, P., Tasouli, E., Skopelitis, I., Poulakou, G., Sympardi, S., & Giamarellos-Bourboulis, E. J. (2025). An NGS-assisted diagnostic workflow for culture-independent detection of bloodstream pathogens and prediction of antimicrobial resistances in sepsis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 15, 1656171. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1656171>
- Power, M. L., Samuel, A., Smith, J. J., Stark, J. S., Gillings, M. R., & Gordon, D. M. (2016). Escherichia coli out in the cold: Dissemination of human-derived bacteria into the Antarctic microbiome. *Environmental Pollution*, 215, 58-65. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.013>
- Rannon, E., Shaashua, S., & Burstein, D. (2025). DRAMMA: A multifaceted machine learning approach for novel antimicrobial resistance gene detection in metagenomic data. *Microbiome*, 13(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s40168-025-02055-4>
- Rapszky, G. A., Do To, U. N., Kiss, V. E., Kóti, T., Walter, A., Gergő, D., Meznerics, F. A., Rakovics, M., Váncsa, S., Kemény, L. V., Csupor, D., Hegyi, P., Filbin, M. R., Varga, C., & Fenyves, B. G. (2025). Rapid molecular assays versus blood culture for bloodstream infections: A systematic review and meta-analysis. *eClinicalMedicine*, 79, 103028. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2024.103028>
- Ratten, L. K., Plummer, E. L., Bradshaw, C. S., Fairley, C. K., Murray, G. L., Garland, S. M., Bateson, D., Tachedjian, G., Masson, L., & Vodstrcil, L. A. (2021). The Effect of Exogenous Sex Steroids on the Vaginal Microbiota: A Systematic Review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 732423. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.732423>
- Romero-Cabrera, J. L., Ankeny, J., Fernández-Montero, A., Kales, S. N., & Smith, D. L. (2022). A Systematic Review and Meta-Analysis of Advanced Biomarkers for

- Predicting Incident Cardiovascular Disease among Asymptomatic Middle-Aged Adults. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 13540. <https://doi.org/10.3390/ijms232113540>
- S. Casimiro-Soriguer, C., Lara, M., Aguado, A., Loucera, C., Ortuño, F. M., Lorusso, N., Navarro-Marí, J. M., Sanbonmatsu-Gámez, S., Camacho-Martinez, P., Merino-Diaz, L., De Salazar, A., Fuentes, A., Lepe, J. A., García, F., Dopazo, J., & Perez-Florido, J. (2025). *A Genomic Surveillance Circuit for Emerging Viral Pathogens*. *Medicine and Pharmacology*. <https://doi.org/10.20944/preprints202503.0458.v1>
- Segui-Perez, C., van Smoorenburg, M. Y., Maranus, A. E., Geijtenbeek, T. B. H., & Strijbis, K. (2025). Impact of bacterial vaginosis on sexually transmitted viral infections: A bacterial point of view. *FEMS Microbiology Reviews*, 49, fuaf039. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaf039>
- Shi, Y., Wang, G., Lau, H. C.-H., & Yu, J. (2022). Metagenomic Sequencing for Microbial DNA in Human Samples: Emerging Technological Advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2181. <https://doi.org/10.3390/ijms23042181>
- Struelens, M. J., Ludden, C., Werner, G., Sintchenko, V., Jokelainen, P., & Ip, M. (2024). Real-time genomic surveillance for enhanced control of infectious diseases and antimicrobial resistance. *Frontiers in Science*, 2, 1298248. <https://doi.org/10.3389/fsci.2024.1298248>
- Terrones-Campos, C., Gallardo-Pizarro, A., Martinez-Urrea, A., Castiella, A., Vergara, A., Gonzalez, A., Egri, N., & Garcia-Vidal, C. (2026). Invasive pulmonary aspergillosis in the ICU: The corticosteroid link. *Pneumonia*, 18(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s41479-025-00189-5>
- Tian, Z., Xue, F., Chen, A., Huang, Y., & Su, X. (2026). Triglyceride-glucose-related indices and cardiovascular outcomes in individuals with pre-frailty or frailty: Insights from a prospective cohort analysis using UK Biobank data. *Cardiovascular Diabetology*, 25(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s12933-025-03066-z>
- Tidbury, F., Brühlhart, G., Müller, G., Pavicic, E., Weidlinger, S., Eichner, G., Von Wolff, M., & Stute, P. (2025). Effectiveness and tolerability of lactic acid vaginal gel compared to oral metronidazole in the treatment of acute symptomatic bacterial vaginosis: A multicenter, randomized-controlled, head-to-head pilot study. *BMC Women's Health*, 25(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12905-024-03513-1>

- Van Dijk, E. L., Naquin, D., Gorrichon, K., Jaszczyszyn, Y., Ouazahrou, R., Thermes, C., & Hernandez, C. (2023). Genomics in the long-read sequencing era. *Trends in Genetics*, 39(9), 649-671. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2023.04.006>
- Vanamala, J. K. P., Sivaramakrishnan, V., & Mummidi, S. (2025). Editorial: Integrated multi-omic studies of metabolic syndrome, diabetes and insulin-related disorders: mechanisms, biomarkers, and therapeutic targets. *Frontiers in Endocrinology*, 15, 1537554. <https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1537554>
- Wallraven, T., Regenbogen, C., Günthner, R., Ribeiro, A., Carbajo-Lozoya, J., Hannane, N., Wunderle, M., Assaf, A., Lech, M., Hanssen, H., Streese, L., Hughes, D., Haller, B., Kotliar, K., Heemann, U., & Schmaderer, C. (2026). Endothelial dysfunction in Fabry disease: Retinal biomarkers link cardiac GLA gene variants with chronic inflammation. *Npj Genomic Medicine*, 11(1), 6. <https://doi.org/10.1038/s41525-025-00540-1>
- Wang, R., Zhang, A., Sun, S., Yin, G., Wu, X., Ding, Q., Wang, Q., Chen, F., Wang, S., Van Dorp, L., Zhang, Y., Jin, L., Wang, X., Balloux, F., & Wang, H. (2024). Increase in antioxidant capacity associated with the successful subclone of hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST11-KL64. *Nature Communications*, 15(1), 67. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-44351-3>
- Wang, Y., Zhao, L., Li, Z., Xi, Y., Pan, Y., Zhao, G., & Zhang, L. (2025). A generative artificial intelligence approach for the discovery of antimicrobial peptides against multidrug-resistant bacteria. *Nature Microbiology*, 10(11), 2997-3012. <https://doi.org/10.1038/s41564-025-02114-4>
- Yang, K., Qin, S., Xu, S., Cui, X., Zhang, Z., Cao, J., Xiao, M., Yang, Y., He, C., Zhou, X., Weng, X., Zhang, W., & Liu, S.-M. (2026). A 5-hydroxymethylcytosine-based noninvasive model for acute myocardial infarction in type 2 diabetes: Implications in cardiovascular outcomes from a 5-year median follow-up study. *Cardiovascular Diabetology*, 25(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s12933-026-03087-2>
- Yin, G. (s. f.). *Clinical Impact of Plasma Metagenomic Next-Generation Sequencing on Infection Diagnosis and Antimicrobial Therapy in Immunocompromised Patients*.
- Yu, H., Liang, D., Ding, X., Gao, H., Fan, G., Song, Y., Sun, S., Huang, Q., Liu, S., & Zhang, Z. (2025). Comparison of microbial culture, metagenomic next-generation sequencing and droplet digital polymerase chain reaction methods for pathogen detection in

- patients with neurosurgical central nervous system infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 15, 1606283. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1606283>
- Yu, W., Sun, M., Li, R., Xin, Y., & Zheng, K. (2025). Unveiling the microbial shift: The impact of group B Streptococcus on vaginal microbiota and inflammation in late pregnancy. *BMC Microbiology*, 25(1), 640. <https://doi.org/10.1186/s12866-025-04387-5>
- Zhang, C., Peng, J., Liu, Z., & Zhou, Q. (2023). Kidney Involvement in Autoinflammatory Diseases. *Kidney Diseases*, 9(3), 157-172. <https://doi.org/10.1159/000529917>
- Zhang, J., Gao, L., Zhu, C., Jin, J., Song, C., Dong, H., Li, Z., Wang, Z., Chen, Y., Yang, Z., Tan, Y., & Wang, L. (2022). Clinical value of metagenomic next-generation sequencing by Illumina and Nanopore for the detection of pathogens in bronchoalveolar lavage fluid in suspected community-acquired pneumonia patients. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 1021320. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1021320>
- Zhang, L., Chen, F., Zeng, Z., Xu, M., Sun, F., Yang, L., Bi, X., Lin, Y., Gao, Y., Hao, H., Yi, W., Li, M., & Xie, Y. (2021). Advances in Metagenomics and Its Application in Environmental Microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 12, 766364. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.766364>
- Zhang, Q., Xu, N., Lei, C., Chen, B., Wang, T., Ma, Y., Lu, T., Penuelas, J., Gillings, M., Zhu, Y., Fu, Z., & Qian, H. (2023). Metagenomic Insight into The Global Dissemination of The Antibiotic Resistome. *Advanced Science*, 10(33), 2303925. <https://doi.org/10.1002/advs.202303925>
- Zhang, S., Li, X., Li, X., Fu, Y., Chen, L., Wang, W., Lin, Q., Lou, H., Yao, Y., Chen, W., Zhong, C., Ye, J., Yao, Y., Guo, H., Yu, Y., & Zhou, H. (2025). Optimisation and clinical validation of a metagenomic third-generation sequencing approach for aetiological diagnosis in bronchoalveolar lavage fluid of patients with pneumonia. *eBioMedicine*, 116, 105752. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2025.105752>
- Zhao, J., Sun, Y., Tang, J., Guo, K., Wang, K., Zhuge, J., & Fang, H. (2024). The clinical application of metagenomic next-generation sequencing in immunocompromised patients with severe respiratory infections in the ICU. *Respiratory Research*, 25(1), 360. <https://doi.org/10.1186/s12931-024-02991-z>
- Zhao, J., Zhuge, R., Hu, B., Wang, Y., Wang, X., Zhang, Y., Yuan, L., Qiu, C., Yan, Y., Zhang, X., Hua, Z., Tang, J., Guo, K., Sun, Y., Wang, K., Qiu, L., Luo, J., Zhang, W., Zhuge, J., & Fang, H. (2025). Clinical impact of bronchoalveolar lavage fluid metagenomic

- next-generation sequencing in immunocompromised patients with severe community-acquired pneumonia in ICU: A multicenter retrospective study. *Infection*, 53(5), 1911-1927. <https://doi.org/10.1007/s15010-025-02520-0>
- Zhao, M., Zhang, Y., Chen, L., Yan, X., Xu, T., Fu, M., Han, Y., Zhang, Y., Zhang, B., Cao, J., Lin, J., Shen, D., Li, S., Zhu, C., & Zhao, W. (2024). Nanopore sequencing of infectious fluid is a promising supplement for gold-standard culture in real-world clinical scenario. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, 1330788. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1330788>
- Zhao, W., Sun, P., Li, W., & Shang, L. (2025). Machine Learning-Based Prediction Model for Multidrug-Resistant Organisms Infections: Performance Evaluation and Interpretability Analysis. *Infection and Drug Resistance*, Volume 18, 2255-2269. <https://doi.org/10.2147/IDR.S459830>
- Zhao, Y., Zhang, W., & Zhang, X. (2024). Application of metagenomic next-generation sequencing in the diagnosis of infectious diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, 1458316. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1458316>