

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 881 280**

51 Int. Cl.:

**G16H 50/20** (2008.01)

**G16B 40/30** (2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.03.2016 PCT/EP2016/056670**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2016 WO16156251**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2016 E 16712848 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.07.2021 EP 3274885**

54 Título: **Método de determinación de la disbiosis del tracto gastrointestinal**

30 Prioridad:

**27.03.2015 GB 201505364**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**29.11.2021**

73 Titular/es:

**GENETIC ANALYSIS AS (100.0%)**

**Kabelgata 8**

**0580 Oslo, NO**

72 Inventor/es:

**LINDAHL, TORBJØRN;**

**KARLSSON, MAGDALENA;**

**SEKELJA, MONIKA y**

**HEGGE, FINN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 881 280 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método de determinación de la disbiosis del tracto gastrointestinal

5 La presente invención proporciona medios mediante los cuales se puede evaluar el estado de la microbiota del tracto GI y se pueden determinar las desviaciones del estado normal (normobiosis), esto es, disbiosis, de una manera sencilla de realizar, fiable y robusta y que sea lo suficientemente flexible para usarse con cualquier técnica para medir niveles de microorganismos en una muestra del tracto GI. Tal información se puede usar en el diagnóstico, control y/o caracterización de enfermedades y afecciones asociadas con perturbaciones en la microbiota del tracto gastrointestinal (GI). En realizaciones más específicas, tales desviaciones pueden cuantificarse hasta cierto punto y, de este modo, la invención proporciona los medios para determinar el grado de la disbiosis del GI, que a su vez puede indicar la gravedad de la enfermedad o afección asociada o se puede usar para controlar la progresión de la enfermedad. o caracterizar la enfermedad o afección asociada.

15 El tracto GI, también denominado tracto digestivo o canal alimentario (y cuyos términos se pueden usar indistintamente con tracto GI), es la serie continua de órganos que comienzan en la boca y terminan en el ano. A lo largo de su extensión, el tracto GI está colonizado por microorganismos de una variedad de especies diferentes. Juntos, el contenido de microorganismos del tracto GI es la microbiota del tracto GI. Las cantidades relativas de los microorganismos constituyentes o grupos de los mismos se pueden considerar como un perfil de la microbiota. Por lo tanto, los perfiles de la microbiota brindan información sobre la diversidad microbiana (esto es, el número de microbios taxonómicamente distintos o grupos taxonómicos distintos que están presentes) en el tracto GI, además de proporcionar información sobre las cantidades relativas de microbios o grupos de los mismos que están presentes.

25 Se cree que muchas enfermedades y afecciones, o etapas de las mismas, están asociadas con perturbaciones en la microbiota del tracto GI, o regiones del mismo. En algunos casos, la enfermedad o afección puede ser causada o exacerbada por el cambio en el perfil de la microbiota del tracto GI o regiones del mismo (esto es, las cantidades relativas de microbios constituyentes y la diversidad de esos microbios). En otros casos, la enfermedad o afección causa, o por algún mecanismo da como resultado, la visualización de un perfil de la microbiota del tracto GI que difiere del estado normal. En algunos contextos, esto puede incluso ser una respuesta adaptativa que intenta abordar el fenotipo patológico de la enfermedad o afección. De acuerdo con lo anterior, al evaluar el estado de la microbiota del tracto GI y determinar las desviaciones del estado normal (normobiosis), esto es, disbiosis, se puede proporcionar información que permita el diagnóstico, control y/o caracterización de enfermedades y afecciones asociadas a perturbaciones en la microbiota del tracto gastrointestinal (GI) o que permite, o al menos es útil en, una evaluación del riesgo de desarrollar una enfermedad o afección que se ha determinado que está asociada con una perturbación del perfil de la microbiota.

40 Es muy probable que las enfermedades y afecciones que afectan al tracto GI den como resultado perfiles de la microbiota que varían del estado normal, por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), enfermedad de Crohn (CD), colitis ulcerosa (UC), síndrome del intestino irritable (IBS), síndrome de sobrecrecimiento bacteriano del intestino delgado y cánceres del tracto GI (por ejemplo, cáncer de boca, faringe, esófago, estómago, duodeno, yeyuno, ileon, ciego, colon, recto o ano) y también existe evidencia de vínculos entre los perfiles de la microbiota del tracto GI y enfermedades y afecciones que se consideran no relacionadas con el tracto GI, por ejemplo, cáncer de mama; espondilitis anquilosante; esteatohepatitis no alcohólica; las enfermedades atópicas, por ejemplo, eccema, asma, dermatitis atópica, conjuntivitis alérgica, rinitis alérgica y alergias alimentarias; trastornos metabólicos, por ejemplo, diabetes mellitus (tipo 1 y tipo 2), obesidad y síndrome metabólico; trastornos neurológicos, por ejemplo, depresión, esclerosis múltiple, demencia y enfermedad de Alzheimer; enfermedad autoinmune (por ejemplo, artritis); desnutrición; síndrome de fatiga crónica y autismo. Se cree que tales perturbaciones del perfil de la microbiota del tracto GI (en términos de cantidades relativas y/o diversidad), que se pueden considerar equivalentes a un desequilibrio en la microbiota del tracto GI, contribuyen a estas enfermedades, ya sea al causar las enfermedades o contribuyendo a su progresión. También se cree que se encontrarán muchas más enfermedades que tienen vínculos causales con perturbaciones del perfil de la microbiota del tracto GI. El mecanismo preciso detrás de esta causalidad no se comprende bien. Está claro que la perturbación de la microbiota del tracto GI da como resultado la subpoblación de ciertos microbios y/o la superpoblación de otros y/o reducciones en la diversidad y esto provoca un cambio o desequilibrio en las actividades relativas de cada población de microbios. Se cree que este cambio en las actividades microbianas provoca que se produzca una reducción de los efectos beneficiosos (por ejemplo, síntesis de vitaminas, ácidos grasos de cadena corta y poliaminas, absorción de nutrientes, inhibición de patógenos, metabolismo de compuestos vegetales) y/o se produzca un aumento de los efectos nocivos (secreción de endotoxinas y otros productos tóxicos) con los consiguientes efectos negativos generales sobre la fisiología general del huésped. Estos efectos pueden entonces manifestarse como enfermedad y dolencia, por ejemplo, los citados anteriormente.

65 Aunque ahora es habitual determinar e incluso cuantificar las cantidades relativas de microorganismos en una muestra del tracto GI y usar tales perfiles para diagnosticar una enfermedad por referencia a perfiles específicos característicos de un estado patológico o para descartar un diagnóstico por referencia. a perfiles específicos característicos de un estado normal (por ejemplo, los documentos WO2012080754; WO2011043654) sigue

existiendo la necesidad de métodos que determinen la probabilidad de que un paciente tenga disbiosis del tracto GI, *vis a vis* un estado normobiótico, que sean fáciles de realizar, confiables y robustos y que son lo suficientemente flexibles para usarse con cualquier técnica para medir niveles de microorganismos en una muestra del tracto GI y que no requieren referencia a perfiles estándar específicos.

5 De este modo, en un primer aspecto, la invención proporciona un método implementado por ordenador para determinar la probabilidad de disbiosis del tracto GI en un sujeto, comprendiendo dicho método:

10 (i) proporcionar un conjunto de datos de prueba, en el que dicho conjunto de datos de prueba comprende al menos un perfil de la microbiota, siendo dicho perfil de la microbiota un perfil de los niveles relativos de una pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en una muestra del tracto GI del sujeto y en el que cada nivel de cada microorganismo o grupo de microorganismos es un elemento de perfil de dicho conjunto de datos de prueba,

15 (ii) aplicar a dicho conjunto de datos de prueba al menos un vector de carga, en el que dicho al menos un vector de carga es al menos una variable latente ortogonal determinada por el análisis de regresión de los niveles de dicha pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en las muestras del tracto GI correspondientes de una pluralidad de sujetos normales, produciendo así un primer conjunto de datos proyectados,

20 (iii) proporcionar dicho primer conjunto de datos proyectados,

(iv) a partir de dicho primer conjunto de datos proyectados, calcular el Q-residual del perfil de la microbiota y comparar el Q-residual del perfil de la microbiota con un valor de Q-residual de umbral normobiótico a disbiótico determinado a partir del análisis correspondiente de dicha pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en las muestras del tracto GI correspondientes de una pluralidad de sujetos normales y/o sujetos con disbiosis,

25 (v) a partir de dicho primer conjunto de datos proyectados calcular el  $T^2$  de Hotelling para el perfil de la microbiota a partir de la varianza explicada por las variables latentes ortogonales determinadas por el análisis de regresión de los niveles de dicha pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en las muestras del tracto GI correspondientes de una pluralidad de sujetos normales de la etapa

30 (ii) y comparar dicha  $T^2$  de Hotelling para el perfil de la microbiota con un valor de  $T^2$  de Hotelling de umbral normobiótico a disbiótico determinado a partir del análisis correspondiente de dicha pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en las muestras correspondientes del tracto GI de una pluralidad de sujetos normales y/o un pluralidad de sujetos con disbiosis,

35 en el que la etapa (v) se puede realizar antes o después o al mismo tiempo que la etapa (iv), y en el que un perfil de la microbiota con un Q-residual o  $T^2$  de Hotelling por encima de dichos umbrales respectivos es indicativo de una probabilidad de disbiosis.

40 En otras realizaciones, se indica una probabilidad de disbiosis si tanto dicho Q-residual como dicho  $T^2$  de Hotelling están por encima de sus respectivos umbrales normobióticos a disbióticos.

45 El método de la invención también se puede considerar un método para identificar la disbiosis, detectar la disbiosis, determinar la presencia de disbiosis o caracterizar la disbiosis. Por lo tanto, se puede considerar que el método de la invención comprende una etapa de determinación de la probabilidad de disbiosis del tracto GI, identificar la disbiosis, detectar la disbiosis, determinar la presencia de disbiosis o caracterizar la disbiosis en el sujeto en base a la indicación de una probabilidad de disbiosis proporcionada en las etapas anteriores. Los resultados de dicha etapa se pueden registrar y opcionalmente almacenar en un medio de grabación/almacenamiento apropiado y/o comunicarse a un médico, el sujeto o intermediario o agente del mismo.

50 En determinadas realizaciones, el método se realiza en una pluralidad de perfiles de la microbiota. Estos perfiles pueden ser del mismo sujeto, por ejemplo, como perfiles paralelos obtenidos de la misma muestra, de diferentes muestras correspondientes del mismo sujeto, por ejemplo, obtenido del sujeto en diferentes momentos, o de diferentes muestras de dicho sujeto. Alternativamente, o además, las muestras correspondientes de otro sujeto se pueden analizar junto con muestras del primer sujeto. En estas realizaciones, puede ser conveniente disponer dichos perfiles de la microbiota en una matriz de datos de prueba, en la que cada elemento de perfil distinto se alinea a través de la pluralidad de perfiles de la microbiota.

60 En un ejemplo particular de estas realizaciones, se proporciona un método implementado por ordenador para determinar la probabilidad de disbiosis del tracto GI en un sujeto, comprendiendo dicho método:

(i) proporcionar una pluralidad de perfiles de la microbiota, en el que cada uno de dichos perfiles de la microbiota es un perfil de los niveles relativos de una pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en

65 (a) una muestra del tracto GI del sujeto, o

(b) diferentes muestras correspondientes del tracto GI de dicho sujeto, en el que cada perfil de la microbiota se ha preparado esencialmente de la misma manera y en el que cada nivel de cada microorganismo o grupo de microorganismos es un elemento de perfil, y ordenar dichos perfiles de la microbiota en una matriz de datos de prueba, en la que cada elemento de perfil distinto se alinea a través de la pluralidad de perfiles de la microbiota,

(ii) aplicar a dicha matriz de datos de prueba al menos un vector de carga en el que dicho al menos un vector de carga es al menos una variable latente ortogonal determinada por el análisis de regresión de los niveles de dicha pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en las muestras correspondientes del tracto GI de una pluralidad de sujetos normales, produciendo así una primera matriz de datos proyectada,

(iii) proporcionar dicha primera matriz de datos proyectada,

(iv) a partir de dicha primera matriz de datos proyectada calcular el Q-residual para cada perfil de la microbiota y comparar el Q-residual para cada perfil de la microbiota con un valor de Q-residual de umbral normobiótico a disbiótico determinado a partir del análisis correspondiente de dicha pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en muestras correspondientes del tracto GI de una pluralidad de sujetos normales y/o sujetos con disbiosis,

(v) a partir de dicha primera matriz de datos proyectada calcular el  $T^2$  de Hotelling para cada perfil de la microbiota a partir de la varianza explicada por las variables latentes ortogonales determinadas por el análisis de regresión de los niveles de dicha pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en las muestras del tracto GI correspondientes de un pluralidad de sujetos normales de la etapa (ii) y comparar dicho  $T^2$  de Hotelling para cada perfil de la microbiota con un valor de umbral normobiótico a disbiótico  $T^2$  de Hotelling determinado a partir del análisis correspondiente de dicha pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en las muestras del tracto GI correspondientes de una pluralidad de sujetos normales y/o una pluralidad de sujetos con disbiosis,

en el que la etapa (v) se puede realizar antes o después o al mismo tiempo que la etapa (iv), y en el que un perfil de la microbiota con un Q-residual o  $T^2$  de Hotelling por encima de dichos umbrales respectivos es indicativo de una probabilidad de disbiosis en el tracto GI del sujeto del que se ha obtenido.

En otro ejemplo particular de estas realizaciones, se proporciona un método de determinación de la probabilidad de disbiosis del tracto GI en una pluralidad de sujetos, comprendiendo dicho método:

(i) proporcionar una pluralidad de perfiles de la microbiota, en el que cada uno de dichos perfiles de la microbiota es un perfil de los niveles relativos de una pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en muestras correspondientes del tracto GI de dichos sujetos que se han preparado esencialmente en el mismo forma y en el que cada nivel de cada microorganismo o grupo de microorganismos es un elemento de perfil, y la disposición de dichos perfiles de la microbiota en una matriz de datos de prueba, en la que cada elemento de perfil distinto está alineado a través de la pluralidad de perfiles de la microbiota,

y realizar las etapas (ii) a (v) del método de la invención descrito *supra*, en el que la etapa (v) se puede realizar antes o después o simultáneamente con la etapa (iv), y en el que un perfil de la microbiota con un Q-residual o  $T^2$  de Hotelling por encima de dichos umbrales respectivos es indicativo de una probabilidad de disbiosis en el tracto GI del sujeto del que se ha obtenido.

Las siguientes secciones describen el detalle del método de la invención en términos del análisis de un único perfil de la microbiota. Estos detalles se aplican *mutatis mutandis* a las realizaciones descritas anteriormente en las que se analizan juntos una pluralidad de perfiles de la microbiota.

Expresado de manera diferente, el método de la invención se puede considerar un método de detección, diagnóstico o control de la disbiosis del tracto GI en un sujeto en el que un perfil de la microbiota con un Q-residual o  $T^2$  de Hotelling, por lo general ambos, por encima de dicho normobiótico respectivo a los umbrales disbióticos indican disbiosis.

La disbiosis se define en este documento como un perfil de la microbiota que difiere o se desvía del perfil de la microbiota que es típico de un sujeto normal y sano, al que se puede hacer referencia en este documento como "normobiosis" o un "estado normobiótico". El alcance de la disbiosis es una medida de qué tan diferente es un perfil de la microbiota de un perfil de la microbiota normal o cuánto se desvía un perfil de la microbiota de un perfil de la microbiota normal. En el contexto del diagnóstico, control y/o caracterización de enfermedades y afecciones asociadas con perturbaciones en la microbiota del tracto GI o la evaluación del riesgo de desarrollar una enfermedad o afección que se haya determinado que está asociada con una perturbación del perfil de la microbiota, la disbiosis se puede definir más específicamente como un perfil de la microbiota que difiere del perfil de la microbiota típico de un sujeto que no tiene dicha enfermedad o afección o no tiene riesgo de desarrollar dicha enfermedad o afección. Se puede obtener un perfil de la microbiota típico de un solo sujeto o incluso una sola muestra de un solo sujeto, pero preferiblemente se obtendrá de una pluralidad de sujetos.

Un perfil de la microbiota (perfil de los niveles relativos de una pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos) de acuerdo con los métodos de la invención es una representación numérica de tales niveles que se ha obtenido de un análisis de una muestra del tracto GI del sujeto. Los valores individuales para tales niveles (los elementos de perfil individuales) pueden ser cualitativos, cuantitativos o semicuantitativos, preferiblemente cuantitativos. El término "cantidad" se podría usar en lugar de "niveles" si fuera apropiado.

El perfil de la muestra del tracto GI puede implicar cualquier medio conveniente mediante el cual se puedan medir, preferiblemente cuantificar los niveles de microorganismos o grupos de microorganismos. Preferiblemente, los medios usados de preparación de los perfiles de la microbiota a partir de una pluralidad de sujetos normales y/o una pluralidad de sujetos con disbiosis de los cuales las variables latentes, por ejemplo, las variables latentes ortogonales, de la etapa (ii) y los valores umbrales de las etapas (iv) y (v) se determinan son esencialmente los mismos que los usados para preparar el al menos un perfil de la microbiota del conjunto de datos de prueba, aunque en otras realizaciones los medios pueden diferir. Si se usan diferentes medios, es posible que sea necesario calcular y aplicar un vector de ajuste para permitir la comparación.

Los métodos de perfilado de uso de acuerdo con la invención son por lo general métodos *in vitro* realizados usando cualquier muestra tomada del tracto GI.

El tracto GI, también denominado tracto digestivo o canal alimentario (y cuyos términos se pueden usar indistintamente con tracto GI) es la serie continua de órganos que comienzan en la boca y terminan en el ano. Específicamente, esta secuencia está formada por la boca, la faringe, el esófago, el estómago, el duodeno, el intestino delgado, el intestino grueso y el ano. Estos órganos se pueden subdividir en el tracto GI superior, que consiste en la boca, faringe, esófago, estómago y duodeno, y el tracto GI inferior, que consiste en el yeyuno, el íleon (junto con el intestino delgado), el ciego, el colon., el recto (junto con el intestino grueso) y el ano.

Una muestra de uso del tracto GI de acuerdo con la invención puede incluir, pero no se limita a, cualquier líquido o sólido extraído del lumen o la superficie del tracto GI o cualquier muestra de cualquiera de los tejidos que forman los órganos del tracto GI. De este modo, la muestra puede ser cualquier contenido luminal del tracto GI (por ejemplo, contenido del estómago, contenido intestinal, moco y excrementos/heces, o combinaciones de los mismos) así como muestras obtenidas mecánicamente del tracto GI, por ejemplo, mediante hisopo, enjuague, aspiración o raspado de una cavidad o superficie del tracto GI o por biopsia de un tejido/órgano del tracto GI. Se prefieren las muestras fecales. La muestra también se puede obtener de parte de un tejido/órgano del tracto GI que se haya extraído quirúrgicamente. La muestra puede ser una porción del tejido/órgano extirpado. En realizaciones en las que la muestra es una muestra de un tejido/órgano del tracto GI, la muestra puede comprender una parte de la mucosa, la submucosa, la muscularis externa, la adventicia y/o la serosa del tejido/órgano del tracto GI. Tales muestras de tejido se pueden obtener mediante biopsia durante un procedimiento endoscópico. Preferiblemente, la muestra se obtiene del tracto GI inferior, esto es, del yeyuno, el íleon, el ciego, el colon, el recto o el ano. Más preferiblemente, la muestra es una muestra mucosa o luminal. Las muestras fecales se pueden recolectar mediante hisopo, enjuague, aspiración o raspado del recto o ano o, más simplemente, la recolección de excrementos durante o después de la defecación.

La muestra se puede usar de acuerdo con la invención en la forma en que se recuperó inicialmente. La muestra también puede haber sufrido algún grado de manipulación, refinamiento o purificación antes de ser usada en los métodos de la invención. De este modo, el término "muestra" también incluye preparaciones de la misma, por ejemplo, materiales de partida relativamente puros o parcialmente purificados, tales como preparaciones semipuras de las muestras mencionadas anteriormente. El término "muestra" también incluye preparaciones de las muestras mencionadas anteriormente en las que el ARN, incluido el ARNr 16S, se ha sometido a transcripción inversa. Se incluye además el producto del cultivo microbiano de dicha muestra.

La purificación puede ser leve, por ejemplo, que no supere la concentración de los sólidos, o células, de la muestra en un volumen más pequeño o la separación de células de una parte o la totalidad del resto de la muestra. En los documentos WO98/51693 y WO01/53525 se describen técnicas de aislamiento celular representativas.

En determinadas realizaciones, se usa de acuerdo con la invención una preparación del ácido nucleico a partir de las muestras mencionadas anteriormente, preferiblemente una preparación en la que se han marcate los ácidos nucleicos. Tales preparaciones incluyen productos de transcripción inversa y/o productos de amplificación de tales muestras o preparaciones de ácido nucleico de las mismas. Puede resultar ventajoso que el ácido nucleico predominante de la preparación de ácido nucleico sea ADN. Estas preparaciones incluyen preparaciones de ácidos nucleicos relativamente puros o parcialmente purificados.

Las técnicas para el aislamiento de ácido nucleico a partir de muestras, incluidas muestras complejas, son numerosas y bien conocidas en la técnica y se describen detalladamente en la bibliografía. Las técnicas descritas en los documentos WO98/51693 y WO01/53525 también se pueden emplear para preparar ácidos nucleicos a partir de las muestras mencionadas anteriormente.

El método de la invención puede incluir una etapa de recogida de muestras y/o procesamiento y/o cultivo de muestras, en particular una etapa de amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, la amplificación de ácido nucleico genómico, en particular la amplificación de ácido nucleico portador de secuencias de nucleótidos características de un microorganismo o grupo de microorganismos.

A menos que el contexto indique lo contrario, el término "muestra correspondiente" se usa en este documento para referirse a muestras del mismo tipo que se han obtenido de diferentes sujetos y/o en diferentes momentos esencialmente de la misma manera y a las que se ha realizado cualquier procesamiento o manipulación sustantiva de las mismas, se lleva a cabo esencialmente de la misma manera.

Los métodos para perfilar la microbiota en una muestra del tracto GI incluyen, pero no se limitan a, análisis de ácidos nucleicos (por ejemplo, enfoques de secuenciación de ácidos nucleicos, enfoques en base a sondas de hibridación de oligonucleótidos, enfoques de amplificación de ácidos nucleicos basados en cebadores), anticuerpos u otros enfoques basados en ligandos de afinidad específicos, enfoques proteómicos y metabolómicos. Preferiblemente, el análisis de la muestra se realizará mediante análisis de secuencia de ácido nucleico y puede adoptar la forma de una técnica de secuenciación. El método de secuenciación de dideoxinucleótidos de Sanger es una técnica bien conocida y ampliamente usada para secuenciar ácidos nucleicos. Sin embargo, más recientemente, los enfoques de secuenciación denominados de "próxima generación" o "segunda generación" (en referencia al método de dideoxinucleótidos de Sanger como el enfoque de "primera generación") se han generalizado. Estas técnicas más nuevas se caracterizan por altos rendimientos, por ejemplo, como consecuencia del uso de paralelo, por ejemplo, reacciones de secuenciación masivamente paralelas, o mediante etapas que requieren menos tiempo. Diversos métodos de secuenciación de alto rendimiento proporcionan secuenciación de una sola molécula y emplean técnicas tales como pirosecuenciación, secuenciación de terminación reversible, secuenciación de sonda escindible por ligación, secuenciación de sonda no escindible mediante ligación, nanobolas de ADN y secuenciación de molécula única en tiempo real.

El análisis de la secuencia de ácido nucleico también puede tomar preferiblemente la forma de un enfoque basado en una sonda de hibridación de oligonucleótidos en el que la presencia de una secuencia de nucleótidos diana se confirma detectando un evento de hibridación específico entre una sonda y su diana. En estos enfoques, la sonda de oligonucleótidos a menudo se proporciona como parte de una matriz más amplia, por ejemplo, una micromatriz de ácido nucleico inmovilizada. Preferiblemente, los conjuntos de sondas de oligonucleótidos y los métodos asociados de los documentos WO2012080754 y WO2011043654 se pueden usar para preparar perfiles de la microbiota de acuerdo con la presente invención.

En determinadas realizaciones, los métodos de la invención pueden incluir etapas en las que se perfila la microbiota de una muestra del tracto GI del sujeto, por ejemplo, mediante cualquiera de las técnicas descritas anteriormente.

En determinadas realizaciones, los microorganismos o grupos de microorganismos de los que se van a determinar los niveles relativos de los mismos están preseleccionados, por ejemplo, son microorganismos o grupos de microorganismos que son especies indicadoras y/o causantes de la enfermedad o afección de interés. Sin embargo, esto no es esencial siempre que se realice una comparación dentro del método de la invención entre los mismos microorganismos.

De este modo, el término "microorganismo", como se usa en el contexto de la invención, puede ser cualquier organismo microbiano, es decir, cualquier organismo microscópico, a saber, demasiado pequeño para ser visto a simple vista, que se puede encontrar en el tracto GI. En particular, como se usa en este documento, el término incluye los organismos que por lo general se consideran microorganismos, particularmente bacterias, hongos, arqueas, algas y protistas. De este modo, el término incluye particularmente organismos que son por lo general unicelulares, pero que pueden tener la capacidad de organizarse en colonias cooperativas simples o estructuras tales como filamentos, hifas o micelios (pero no tejidos verdaderos) bajo ciertas condiciones. El microorganismo puede ser procariota o eucariota y puede ser de cualquier clase, género o especie de microorganismo. Los ejemplos de microorganismos procarióticos incluyen, pero no se limitan a, bacterias, incluidos los micoplasmas (por ejemplo, bacterias Gram positivas, Gram negativas o bacterias que no responden a la prueba de Gram) y arqueobacterias. Los microorganismos eucariotas incluyen hongos, algas y otros que están, o han sido, clasificados en el reino taxonómico Protista o considerados protistas, e incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, protozoos, diatomeas, protofitas y mohos similares a hongos.

En realizaciones preferidas, los grupos de microorganismos se pueden seleccionar de Actinobacteria (por ejemplo, Atopobium, Bifidobacterium), Bacteroidetes (por ejemplo, Bacteroidia, por ejemplo, Alistipes, Bacteroides, Prevotella, Parabacteroides, Bacteroidetes (en particular *Bacteroides fragilis*), Firmicutes (por ejemplo, Bacilli, por ejemplo, Bacillus, Lactobacillus, Pedicoccus, Streptococcus; Clostridia, por ejemplo, Anaerotruncus, Blautia, Clostridium, Desulfitispora, Dorea, Eubacterium, Faecalibacterium, Ruminococcus; Erysipelotrichia, por ejemplo, Catenibacterium, Coprobacillus, Unclassified Erysipelotrichaceae; Negativicutes, por ejemplo, Dialister, Megasphaera, Phascolarctobacterium; Epsilonproteobacteria; Veillonella/Helicobacter (en particular *Dialister invisus*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus bromii*, *Ruminococcus gnavus*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus thermophilus*)), Proteobacteria (por ejemplo, Gammaproteobacteria, por ejemplo,

Acinetobacter, Pseudomonas, Salmonella, Citrobacter, Cronobacter, Enterobacter, Shigella, Escherichia), Tenericutes (por ejemplo, Mollicutes, por ejemplo, Mycoplasma (en particular *Mycoplasma hominis*), y Verrucomicrobia (por ejemplo, Verrucomicrobiae, por ejemplo, Akkermansia (en particular *Akkermansia muciphila*)).

5 En el contexto de IBS, Firmicutes (Bacilli), Proteobacteria (*Shigella/Escherichia*), Actinobacteria y *Ruminococcus gnavus* pueden ser importantes. De manera similar, en el contexto de IBD, Proteobacteria (*Shigella/Escherichia*), Firmicutes, específicamente *Faecalibacterium prausnitzii*, y Bacteroidetes (Bacteroides y Prevotella) pueden ser importantes.

10 De este modo, en determinadas realizaciones, las referencias a perfiles de la microbiota se pueden considerar referencias a perfiles de bacteriota.

El número de microorganismos o grupos de microorganismos de los que se van a determinar los niveles relativos de los mismos no está limitado y, por lo tanto, puede ser de al menos 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100. En  
15 otras realizaciones, el número puede ser menor que 500, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60 o 50. Mediante la presente se describe cualquier intervalo definido por puntos finales de cualquiera de estos números.

En determinadas realizaciones, los perfiles de la microbiota se pueden normalizar para tener en cuenta la variación entre muestras dentro de cada ejecución experimental de elaboración de perfiles y/o la variación interexperimental entre cada ejecución experimental de elaboración de perfiles mediante el uso de controles apropiados durante o  
20 después del análisis de las muestras. Ventajosamente, se puede realizar una normalización adicional para permitir variaciones de lotes en los consumibles de laboratorio y para corregir las señales de fondo.

En determinadas realizaciones, se puede aplicar un vector de centrado a cada elemento de perfil de la microbiota y/o cada perfil de la microbiota, en el que dicho vector se deriva del valor medio para dicho elemento de perfil de la  
25 microbiota o perfil de la microbiota obtenido de muestras correspondientes de una pluralidad de sujetos normales que han sido perfilados de la misma manera.

La matriz de datos de prueba, si se usa, se organizará por lo general de manera que cada muestra se presente como una sola fila y cada microorganismo o grupo de microorganismos cuyos niveles relativos de los mismos se han  
30 determinado se presenta como una única columna. Se puede usar el recíproco de esta disposición.

El término "variables latentes" puede referirse a un subconjunto de variables dentro de un conjunto de datos que se relacionan con correlaciones y tendencias potencialmente desconocidas. El término también incluye variables que se  
35 determinan a partir de la combinación de variables originales en un conjunto de datos (por ejemplo, el nivel de un microorganismo o grupo de microorganismos en una muestra del tracto GI), específicamente aquellas que reflejan correlaciones entre variables y tendencias en el conjunto de datos de una manera más significativa que las variables originales. De este modo, las variables latentes se derivan por lo general de la descomposición algorítmica de un conjunto de datos, por ejemplo, por análisis de regresión, por ejemplo, análisis de regresión de mínimos cuadrados  
40 parciales, análisis de componentes principales (PCA), análisis de correlación canónica, análisis de redundancia, análisis de correspondencia y análisis de correspondencia canónica. Las variables latentes pueden ser ortogonales o no ortogonales. Las variables latentes ortogonales son variables latentes que están orientadas perpendicularmente entre sí. Las variables latentes de uso en la invención son variables latentes ortogonales

Las variables latentes, en particular las variables latentes ortogonales de uso de acuerdo con la invención, se pueden determinar por cualquier medio conveniente, por ejemplo, el análisis de regresión de mínimos cuadrados  
45 parciales de los niveles de dicha pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en muestras del tracto GI de una pluralidad de sujetos normales, preferiblemente que hayan sido perfilados de la misma manera. En determinadas realizaciones las variables latentes ortogonales se determinan mediante la transformación ortogonal en componentes principales de los niveles de dicha pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en  
50 muestras del tracto GI de una pluralidad de sujetos normales, preferiblemente que se hayan perfilado de la misma forma. En realizaciones preferidas, la transformación ortogonal en componentes principales se realiza mediante PCA, análisis de correlación canónica, análisis de redundancia, análisis de correspondencia y análisis de correspondencia canónica.

En determinadas realizaciones, al menos 2 vectores, por ejemplo, se aplican al menos 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 o  
55 20 vectores al conjunto de datos. En otras realizaciones, no se aplican más de 50 vectores, por ejemplo, no más de 40, 30, 25, 20 o 15 vectores al conjunto de datos. Por la presente se describe cualquier intervalo definido por puntos finales de cualquiera de estos números.

De acuerdo con la invención, los vectores de carga son variables latentes ortogonales determinadas por el análisis de regresión de los niveles de una pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos, por ejemplo, por  
60 PCA, análisis de correlación canónica, análisis de redundancia, análisis de correspondencia y análisis de correspondencia canónica, por lo que el número de vectores de carga que se pueden usar de acuerdo con la invención está limitado por el número de microorganismos o grupos de microorganismos investigados o el número de muestras de tracto GI de la pluralidad de sujetos normales de sujetos con disbiosis que se han perfilado, el que

sea menor: cuanto mayor sea el número de microorganismos o grupos de microorganismos investigados y cuanto mayor sea el número de muestras utilizadas, mayor será el número de variables latentes ortogonales y, por tanto, vectores asociados, que pueden estar presentes y se pueden seleccionar entre ellos.

5 La determinación de las variables latentes ortogonales se puede realizar como parte del método de la invención, pero más por lo general se puede realizar por separado o las variables latentes ortogonales se pueden obtener de otras fuentes.

En determinadas realizaciones, el vector o los vectores de carga se aplican en forma de matriz de proyección.

10 En realizaciones preferidas, aplicar el vector o los vectores de carga al conjunto de datos de prueba comprende multiplicar los elementos del perfil del conjunto de datos por el vector o los vectores de carga, por ejemplo, en forma de matriz de proyección. De este modo, esta multiplicación puede ser una multiplicación de matrices.

15 En otras realizaciones, la etapa (ii) en la que se produce un primer conjunto de datos proyectados comprende además aplicar al menos un valor propio determinado a partir de dicho al menos un vector de carga al conjunto de datos de prueba. El valor propio se puede aplicar antes o después del vector de carga o junto con el vector de carga. Aplicar dicho valor propio puede comprender multiplicar el valor propio con los elementos del perfil del conjunto de datos de prueba antes o después de la aplicación del vector de carga al conjunto de datos de prueba. En otras realizaciones, el valor propio se puede multiplicar con el vector de carga antes de la aplicación al conjunto de datos de prueba, por ejemplo, multiplicación con los elementos de perfil del conjunto de datos de prueba. Si es apropiado en estas realizaciones, las referencias a un valor propio pueden incluir formas de raíz, exponenciación o logaritmo del mismo. Las referencias a la multiplicación incluyen la multiplicación de matrices. En otras realizaciones más en las que se aplica una pluralidad de valores propios en la etapa (ii), los valores propios se aplican en forma de una matriz con los valores propios dispuestos en la diagonal principal, pero esto no es esencial.

20 Los valores umbrales de normobiótico a disbiótico con los que se comparan el Q-residual de la etapa (iv) y el  $T^2$  de Hotelling de la etapa (v) se determinan a partir del análisis correspondiente de la misma pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en una muestra del tracto GI correspondiente de una pluralidad de sujetos normales y/o sujetos con disbiosis. Los valores mostrados por estos sujetos proporcionarán una indicación de dónde se encuentra el umbral entre normobiosis y disbiosis. Cuanto mayor sea el número de sujetos analizados, más exactamente se podrá determinar el umbral y preferiblemente se analizará una pluralidad tanto de sujetos normales como de sujetos con disbiosis en la determinación de dichos valores umbrales de normobióticos a disbióticos. Estos umbrales representan el límite entre normobiosis y disbiosis para una pluralidad particular de microorganismos o grupos de microorganismos en una muestra particular del tracto GI que se han perfilado de una manera particular y, por lo tanto, diferirán para cada realización general de la invención y, por lo tanto, deben prepararse antes del momento en que se realiza la comparación con las muestras de prueba.

30 El análisis correspondiente significa que los valores umbrales se determinan usando esencialmente los mismos medios para procesar los resultados del perfil de la muestra del tracto GI correspondiente que los usados para preparar el Q-residual de la etapa (iv) y el  $T^2$  de Hotelling de la etapa (v). Preferiblemente, el análisis correspondiente significa además que los valores umbrales se determinan usando esencialmente los mismos medios de perfilado en dichas muestras correspondientes.

45 Más específicamente, dichos valores umbrales se pueden determinar mediante:

(i) proporcionar un conjunto de datos normobióticos, en el que dicho conjunto de datos normobióticos comprende al menos un perfil de la microbiota, siendo dicho perfil de la microbiota un perfil de los niveles relativos de una pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en una muestra del tracto GI de un sujeto normal y en el que cada nivel de cada microorganismo o grupo de microorganismos es un elemento de perfil de dicho conjunto de datos,

(ii) aplicar a dicho primer conjunto de datos normobióticos el mismo al menos una variable latente ortogonal determinada por el análisis de regresión de los niveles de dicha pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en las muestras correspondientes del tracto GI de una pluralidad de sujetos normales aplicados a dicho conjunto de datos de prueba, produciendo así un primer conjunto proyectado de datos normobióticos,

(iii) proporcionar dicho primer conjunto de datos normobióticos proyectado,

60 (iv) a partir de dicho primer conjunto de datos normobióticos proyectados, se calcula el Q-residual del perfil de la microbiota,

(v) a partir de dicho primer conjunto de datos normobióticos proyectados, calcular el  $T^2$  de Hotelling para el perfil de la microbiota a partir de la varianza explicada por las variables latentes ortogonales determinadas por el análisis de regresión de los niveles de dicha pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en las muestras del tracto GI correspondientes de una pluralidad de sujetos normales de la etapa (ii),

en el que la etapa (v) se puede realizar antes o después o al mismo tiempo que la etapa (iv), y en el que dicho Q-residual y dicho  $T^2$  de Hotelling son, o al menos pueden contribuir a, dichos umbrales normobióticos a disbióticos respectivos.

5 Más específicamente, dichos valores umbrales también se pueden determinar mediante:

(i) proporcionar un conjunto de datos disbióticos, en el que dicho conjunto de datos disbióticos comprende al menos un perfil de la microbiota, siendo dicho perfil de la microbiota un perfil de los niveles relativos de una pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en una muestra del tracto GI de un sujeto con disbiosis y donde cada nivel de cada microorganismo o grupo de microorganismos es un elemento de perfil de dicho conjunto de datos,

(ii) aplicar a dicho primer conjunto de datos disbióticos la misma al menos una variable latente ortogonal determinada por el análisis de regresión de los niveles de dicha pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en las muestras del tracto GI correspondientes de una pluralidad de sujetos normales aplicados a dicho conjunto de datos de prueba, produciendo así un primer conjunto de datos disbióticos proyectados,

(iii) proporcionar dicho primer conjunto de datos disbióticos proyectados,

(iv) a partir de dicho primer conjunto de datos disbióticos proyectados, calcular el Q-residual de la microbiota,

(v) a partir de dicho primer conjunto de datos disbióticos proyectados, calcular el  $T^2$  de Hotelling para el perfil de la microbiota a partir de la varianza explicada por las variables latentes ortogonales determinadas por el análisis de regresión de los niveles de dicha pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en las muestras del tracto GI correspondientes de una pluralidad de sujetos normales de la etapa (ii),

en el que la etapa (v) se puede realizar antes o después o al mismo tiempo que la etapa (iv), y en el que dicho Q-residual y dicho  $T^2$  de Hotelling son, o al menos pueden contribuir a, dichos umbrales normobióticos a disbióticos respectivos.

Por lo general, los valores umbrales de normobióticos a disbióticos se seleccionan para optimizar la separación de clases. Expresado de otra manera, los valores umbrales se establecerán de tal manera que valores de al menos el 85 %, por ejemplo, al menos el 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de los sujetos normales analizados estarán en un lado del umbral y valores del 85 %, por ejemplo, al menos el 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de los sujetos con disbiosis analizados estarán al otro lado del umbral.

En realizaciones en las que los datos de prueba son cuantitativos o semicuantitativos, el método de la invención se puede realizar de una manera que proporcione una medida cuantitativa o semicuantitativa del grado de la disbiosis o el grado de la desviación de la normobiosis. Tales medidas pueden ser ventajosas en el contexto del diagnóstico, pronóstico y/o caracterización de enfermedades o afecciones asociadas con disbiosis, ya que una mayor extensión de disbiosis puede indicar una manifestación más grave de la enfermedad o afección o un subtipo particular de la misma. Tales medidas también pueden permitir un control más preciso de la progresión de la enfermedad al ofrecer más datos comparativos.

En tales realizaciones, el grado en que el Q-residual de la etapa (iv) y el  $T^2$  de Hotelling de la etapa (v) difieren de los valores umbrales normobióticos a disbióticos con los que se comparan indicará (o proporcionará una medida de, o ser proporcional a) el grado de la disbiosis.

En realizaciones más específicas, la disbiosis se puede cuantificar combinando el Q-residual de la etapa (iv) y el  $T^2$  de Hotelling de la etapa (v) en una única métrica para la disbiosis. Esta segunda combinación se puede lograr por cualquier medio conveniente que dé como resultado una salida informativa significativa de esta etapa. La segunda combinación puede ser simplemente la suma o multiplicación del Q-residual de la etapa (iv) y el  $T^2$  de Hotelling de la etapa (v).

De este modo, la invención proporciona un método para cuantificar la disbiosis, comprendiendo dicho método realizar el método de la invención descrito anteriormente, en el que dichas comparaciones con umbrales normobióticos a disbióticos comprenden combinar el Q-residual de la etapa (iv) y el  $T^2$  de Hotelling de la etapa (v) en una única métrica para la disbiosis.

En otras realizaciones, se puede producir una manipulación adicional, por ejemplo, la aplicación de técnicas de raíz, exponenciación o logaritmo al Q-residual de la etapa (iv) y/o al  $T^2$  de Hotelling de la etapa (v). En realizaciones adicionales, se pueden aplicar ponderaciones a una o ambas de estas combinaciones (discutidas con más detalle a continuación). En otras realizaciones más, la segunda combinación también puede manipularse más. En otras realizaciones más, se calcula la distancia euclidiana desde el origen tanto para el Q-residual de la etapa (iv) como para el  $T^2$  de Hotelling de la etapa (v). De este modo, en determinadas realizaciones, el Q-residual de la etapa (iv) y el  $T^2$  de Hotelling de la etapa (v) se elevan al cuadrado, luego se suman y luego se determina la raíz cuadrada de

ese cálculo para dar dicha métrica única para la disbiosis. Esto se puede representar como la siguiente fórmula (Fórmula I) en la que Qres representa el Q-residual de la etapa (iv) y T<sup>2</sup> representa el T<sup>2</sup> de Hotelling de la etapa (v).

**Fórmula I:**

$$r = \sqrt{\{T^2\}^2 + Qres^2}$$

5 Una sola métrica es muy conveniente y ofrece ventajas en la interpretación de resultados de diferentes sujetos. Sorprendentemente, se ha encontrado que el Q-residual de la etapa (iv) y el T<sup>2</sup> de Hotelling de la etapa (v) están potencialmente correlacionados y que un valor alto para una combinación se puede asociarse con un valor alto de la otra. Se ha reconocido que la simple suma de estos valores puede sobrerrepresentar el grado de la disbiosis y, por lo tanto, el uso de la distancia euclidiana puede ser ventajoso, ya que reduce el riesgo de que la métrica única sobrerrepresente el grado de la disbiosis planteada por la simple suma de valores en la segunda combinación.

10 Un umbral normobiótico a disbiótico para la misma pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en una muestra del tracto GI correspondiente expresado en los mismos términos que la métrica descrita anteriormente se puede calcular de la misma manera a partir de una pluralidad de sujetos normales y/o sujetos con disbiosis y el grado en el que la métrica de una muestra de prueba difiera de dicho umbral será proporcional al grado de la disbiosis.

15 En realizaciones preferidas, la combinación del Q-residual de la etapa (iv) y el T<sup>2</sup> de Hotelling de la etapa (v) en una única métrica para la disbiosis comprenderá escalar dicho Q-residual de la etapa (iv) y el T<sup>2</sup> de Hotelling de la etapa (v) para dar como resultado valores de magnitud similar, por ejemplo, dividiendo el Q-residual de la etapa (iv) y el T<sup>2</sup> de Hotelling de la etapa (v) por sus respectivos umbrales de clase normobiótica a disbiótica (esto es, los umbrales normobióticos a disbióticos con los que se compara en las etapas (iv) y (v) respectivamente). Esto se puede representar como la siguiente fórmula (Fórmula II) en la que q representa el Q-residual de la etapa (iv) y T<sup>2</sup> representa el T<sup>2</sup> de Hotelling de la etapa (v).

**Fórmula II:**

$$r = \sqrt{\left(\frac{q}{q_{thres}}\right)^2 + \left(\frac{T^2}{T^2_{thres}}\right)^2}$$

25 Una métrica única escalada es muy conveniente y ofrece ventajas en la interpretación de los resultados de diferentes sujetos.

30 En otras realizaciones más, con el fin de cuantificar la disbiosis, dicha métrica única (preferiblemente dicha métrica única escalada) se puede representar además en una escala numérica finita, preferiblemente continua, de normobiótica a disbiótica (o viceversa) con separación de clases (el límite entre normobiosis y disbiosis) en un punto predeterminado, preferiblemente un valor entero predeterminado, en esa escala numérica finita que representa, o es, una combinación de, preferiblemente la suma de, los umbrales de clase normobiótica a disbiótica (escalada de manera similar si es apropiado) de las etapas (iv) y (v).

35 El grado en el que dicha métrica única determinada para una muestra de prueba difiere del punto de separación de clases en la dirección del punto final disbiótico máximo de la escala es proporcional al grado de disbiosis. Preferiblemente, la porción de la escala numérica entre el punto de separación de clases y el punto final disbiótico máximo de la escala se subdivide en regiones discretas que cuantifican adicionalmente la disbiosis. Preferiblemente, dichas regiones tienen límites en puntos definidos, por ejemplo, enteros numéricos.

40 De este modo, la invención proporciona un método para cuantificar la disbiosis, comprendiendo dicho método realizar el método de la invención descrito anteriormente y trazar además dicha métrica única para la disbiosis en una escala numérica finita, preferiblemente continua, con separación de clases en un punto predeterminado que representa, o es una combinación de los umbrales de clase normobiótica a disbiótica de las etapas (iv) y (v), escalados de manera similar si se ha aplicado el escalado.

45 De manera similar, el grado en el que dicha métrica única determinada para una muestra de prueba difiere del punto de separación de clases en la dirección del punto final normobiótico máximo de la escala es inversamente proporcional al grado en el que la muestra de prueba se desvía de la definición de normal del modelo. Para ayudar a visualizar esto, la porción de la escala numérica entre el punto de separación de clases y el punto final normobiótico máximo de la escala se puede subdividir en regiones discretas que cuantifican aún más la desviación de la definición de normal del modelo. Preferiblemente, dichas regiones tienen umbrales en puntos definidos, por ejemplo, enteros numéricos.

Para facilitar la interpretación, la métrica única se puede informar en términos del umbral más cercano entre las diversas regiones de la escala o el punto de separación de clases.

5 Trazar dicha métrica única en dicha escala numérica, esto es, una escala con un punto de separación de clases que representa, o es, una combinación de, preferiblemente la suma de, los valores umbrales de clase normobiótica a disbiótica de las etapas (iv) y (v), asegura que ambos elementos de la métrica contribuyan al hallazgo del grado de la disbiosis.

10 Como resultado del hecho de que dicha métrica única es una combinación de dos medidas diferentes (el Q-residual de la etapa (iv) y el  $T^2$  de Hotelling de la etapa (v), el límite de clase (normobiosis a disbiosis) definido por estas medidas es bidimensional y simplemente sumando los valores umbrales de clase normobióticos a disbióticos asociados para ambas medidas para determinar el punto de separación de clases en dicha escala numérica finita puede no ser capaz de resolver completamente la variación entre los resultados de muestras normobióticas y disbióticas que pueden verse en o cerca del límite de clase cuando solo una de estas medidas está más allá de su valor de umbral respectivo. Por lo tanto, puede ser más preciso, al trazar más la métrica única en una escala  
15 numérica finita de normobiótico a disbiótico (o viceversa) con separación de clases (el límite entre normobiosis y disbiosis) en un punto predeterminado, para establecer el punto de separación de clases predeterminado diferencialmente dependiendo de si dicha muestra de prueba tiene al menos una de estas medidas más allá de su valor umbral respectivo. En estas realizaciones, el punto de separación de clases para una muestra de prueba que  
20 tiene al menos uno de los Q-residuales de la etapa (iv) o el  $T^2$  de Hotelling de la etapa (v) por encima de los valores umbrales de clase normobiótica a disbiótica de las etapas (iv) y (v), respectivamente, corresponderá, o preferiblemente será, el de uno u otro de los valores umbrales de clase normobiótica a disbiótica excedidos de las etapas (iv) o (v). También en estas realizaciones, el punto de separación de clases para una muestra de prueba en la que ni el Q-residual de la etapa (iv) ni el  $T^2$  de Hotelling de la etapa (v) están más allá de los valores umbrales  
25 normobióticos a disbióticos de las etapas (iv) y (v), respectivamente, corresponderá a, o preferiblemente será, la suma de los umbrales de clase normobiótica a disbiótica de las etapas (iv) y (v). En estas realizaciones, "corresponde a" incluye las formas de raíz, exponenciación o logaritmo de las mismas, preferiblemente la forma de raíz cuadrada de dichos valores umbral.

30 De este modo, la invención proporciona un método para cuantificar la disbiosis, comprendiendo dicho método realizar el método de la invención descrito anteriormente y trazar además la métrica única en una escala numérica finita con separación de clases en un punto predeterminado, en el que para una muestra de prueba que tiene en al menos uno del Q-residual de la etapa (iv) o el  $T^2$  de Hotelling de la etapa (v) por encima de los valores umbrales de clase normobiótica a disbiótica de las etapas (iv) y (v), respectivamente, dicho punto de separación de clases  
35 corresponderá al de uno u otro de los valores umbrales de clase normobiótica a disbiótica excedidos de las etapas (iv) o (v) y para una muestra de prueba en la que ni el Q-residual de la etapa (iv) ni el  $T^2$  de Hotelling de la etapa (v) están más allá de los valores umbrales de normobiótico a disbiótico de las etapas (iv) y (v), respectivamente, dicho punto de separación de clases corresponderá a la suma de los umbrales de clase normobiótico a disbiótico de las etapas (iv) y (v).

40 En estas realizaciones puede ser conveniente si se aplica un valor representativo al punto de separación de clases que permanece consistente independientemente del valor real del punto de separación de clases aplicable a la muestra de prueba en cuestión, facilitando de este modo el uso de la misma escala para informar los resultados de sujetos normobióticos o disbióticos.

45 En las realizaciones en las que una porción de la escala numérica entre el punto de separación de clases y el punto final disbiótico máximo de la escala se subdivide en regiones discretas que cuantifican adicionalmente la disbiosis en términos de números enteros definidos, puede ser ventajoso calcular dónde dicha métrica única cae más precisamente como un valor decimal entre dichos valores enteros, así se puede lograr una cuantificación más  
50 precisa de la disbiosis. En tales realizaciones, el cálculo de dichos valores decimales entre dichos números enteros se realiza mediante una función de distribución de densidad o probabilidad. Numerosas técnicas están disponibles para la persona experta que podría seleccionar o combinar tales técnicas para satisfacer sus necesidades o diseñar nuevas técnicas. A modo de ejemplos no limitantes, se pueden usar las siguientes distribuciones: distribución logarítmica normal, distribución uniforme continua, distribución uniforme discreta, distribución normal (o gaussiana),  
55 distribución t de Student, distribución chi-cuadrado, distribución F, distribución normal logit, distribución log-logística, distribución de Pareto, distribución de Bernoulli, distribución binomial, distribución geométrica, distribución de Poisson, distribución exponencial, distribución gamma, distribución beta. En estas realizaciones, la métrica única aún se puede informar en términos del umbral más cercano entre las diversas regiones de la escala o el punto de separación de clases pero, al calcular el valor decimal, determinar qué umbral está más cercano será más preciso.

60 En realizaciones preferidas, los efectos de la variación técnica sobre el trazado de los datos de prueba en dicha escala numérica finita, en particular entre dicho punto de separación de clases y dicho punto final de disbiosis máxima, se minimizan aplicando ponderaciones al Q-residual de la etapa (iv) y/o el  $T^2$  de Hotelling de la etapa (v) durante la segunda etapa de combinación. Cuando se aplican ponderaciones a ambas combinaciones, las ponderaciones pueden ser las mismas o pueden diferir. Uno u otro puede ser cero. Se pueden determinar ponderaciones apropiadas sin una carga excesiva analizando repetidamente una muestra de referencia o una  
65

pluralidad de muestras de referencia, por ejemplo, una muestra o muestras de un sujeto con disbiosis del tracto GI, de acuerdo con la invención y la determinación de qué valores de ponderación, si los hay, para cada combinación dan como resultado la salida interexperimental más estable.

- 5 En realizaciones preferidas, esto se puede expresar como la siguiente fórmula (Fórmula III) en la que q representa el Q-residual de la etapa (iv),  $T^2$  representa el  $T^2$  de Hotelling de la etapa (v) y w representa la ponderación aplicada.

### Fórmula III

$$r = \sqrt{w_q * \left(\frac{q}{q_{thres}}\right)^2 + w_{T^2} * \left(\frac{T^2}{T^2_{thres}}\right)^2}$$

- 10 En determinadas realizaciones, se pueden aplicar ponderaciones al análisis de muestras que tienen al menos uno de los Q-residual de la etapa (iv) o el  $T^2$  de Hotelling de la etapa (v) por encima de los valores umbrales de clase normobiótica a disbiótica de las etapas (iv) y (v), respectivamente, pero no al análisis de una muestra de prueba en la que ni el Q-residual de la etapa (iv) ni el  $T^2$  de Hotelling de la etapa (v) están más allá de los valores umbrales normobióticos a disbióticos de las etapas (iv) y (v), respectivamente.

- 15 En determinadas realizaciones, los métodos de la invención no comprenden una etapa en la que se compara un perfil de la microbiota de la muestra del tracto GI, por ejemplo, directamente, a un perfil correspondiente representativo de una enfermedad o afección particular o estadio de la misma o al perfil correspondiente representativo de un sujeto sano o un paciente con disbiosis del tracto GI.

- 20 Como se discutió anteriormente, se cree que muchas enfermedades y afecciones, o estadios de las mismas, están asociadas con perturbaciones en la microbiota del tracto GI, o regiones del mismo. Por lo tanto, los métodos de la invención descritos anteriormente, en particular los métodos cuantitativos o semicuantitativos, se pueden usar para obtener y proporcionar información relevante para el diagnóstico, control y/o caracterización de enfermedades y afecciones asociadas con perturbaciones en la microbiota del tracto GI o la evaluación del riesgo de desarrollar una enfermedad o afección que se asocia con una perturbación del perfil de la microbiota del tracto GI. Como se desprende de la discusión en este documento, la perturbación del perfil de la microbiota del tracto GI se puede considerar disbiosis del tracto GI.

- 30 De este modo, en un aspecto adicional, la invención proporciona un método para obtener información relevante para el diagnóstico, control y/o caracterización de enfermedades y afecciones asociadas con perturbaciones en la microbiota del tracto GI o la evaluación del riesgo de desarrollar una enfermedad o afección que está asociada con una perturbación del perfil de la microbiota del tracto GI, comprendiendo dicho método realizar un método como se define anteriormente, en el que el producto de dicho método como se define anteriormente, la indicación de la probabilidad de disbiosis o el grado de disbiosis, proporciona dicha información.

- 35 En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para diagnosticar, controlar y/o caracterizar enfermedades y afecciones asociadas con perturbaciones en la microbiota del tracto GI o la evaluación del riesgo de desarrollar una enfermedad o afección que está asociada con una perturbación del perfil de la microbiota del tracto GI, comprendiendo dicho método realizar un método como se define anteriormente en el que la indicación de la probabilidad de disbiosis o el grado de la disbiosis es indicativa de la presencia o ausencia, el riesgo de desarrollo, el progreso de, o las características de dicha enfermedad o afección asociadas con perturbaciones en la microbiota del tracto GI. En estas realizaciones, el método puede comprender además una etapa de hacer un diagnóstico, de controlar y/o de hacer una caracterización de una enfermedad o afección asociada con perturbaciones en la microbiota del tracto GI o de hacer una evaluación del riesgo de desarrollar una enfermedad. enfermedad o afección que está asociada con una perturbación del perfil de la microbiota del tracto GI en base a la indicación de la probabilidad o el grado de disbiosis proporcionada en las etapas anteriores. Los resultados de dicha última etapa se pueden registrar y opcionalmente almacenar en un medio de grabación/almacenamiento apropiado y/o comunicarse a un médico, el sujeto o intermediario o agente del mismo.

- 50 En determinadas realizaciones, dicho método se realiza con perfiles de la microbiota de una pluralidad de muestras del tracto GI tomadas del paciente en diferentes momentos. De esta manera, se pueden investigar los cambios en la microbiota del tracto GI de los sujetos a lo largo del tiempo.

- 55 Las enfermedades y afecciones asociadas con perturbaciones en la microbiota del tracto GI, esto es, disbiosis, se pueden considerar aquellas que pueden ser causadas o exacerbadas por un cambio en el perfil de la microbiota del tracto GI (o regiones del mismo) aquellos que causan, o dan como resultado, la visualización de un perfil de la microbiota del tracto GI (o regiones del mismo) que difiere del estado normal o aquellos que pueden estar caracterizados o identificados por la visualización de un perfil de la microbiota del tracto GI (o regiones del mismo) que difiere del estado normal. Los ejemplos de tales enfermedades y afecciones incluyen, pero no se limitan a,

trastornos funcionales del tracto GI, por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), enfermedad de Crohn (CD), colitis ulcerosa (UC), síndrome del intestino irritable (IBS) y dispepsia; síndrome de sobrecrecimiento bacteriano del intestino delgado y cánceres del tracto GI (por ejemplo, cáncer de boca, faringe, esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon, recto o ano); cáncer de mama; espondilitis anquilosante; esteatohepatitis no alcohólica; enfermedades atópicas, por ejemplo, eccema, asma, dermatitis atópica, conjuntivitis alérgica, rinitis alérgica y alergias alimentarias; trastornos metabólicos, por ejemplo, diabetes mellitus (tipo 1 y tipo 2), obesidad y síndrome metabólico; trastornos neurológicos, por ejemplo, depresión, esclerosis múltiple, demencia y enfermedad de Alzheimer; enfermedad autoinmune (por ejemplo, artritis); desnutrición; síndrome de fatiga crónica y autismo. En realizaciones preferidas, los métodos de la invención se realizan en el contexto de IBS.

"Diagnóstico" se refiere a la determinación de la presencia o existencia de una enfermedad o afección o estadio de la misma en un organismo. "Control" se refiere a establecer el grado de o los posibles cambios en una enfermedad o afección, particularmente cuando se sabe que un individuo padece una enfermedad o afección, por ejemplo, para controlar los efectos del tratamiento o el desarrollo de una enfermedad o afección, por ejemplo, para determinar la idoneidad de un tratamiento, para proporcionar un pronóstico y/o para determinar si un paciente está en remisión o recaída. "Caracterizar" incluye determinar las características de una enfermedad o afección particular de un sujeto, por ejemplo, el grado o la gravedad de la enfermedad o afección o el subtipo de la misma, incluida la probabilidad de responder a terapias particulares.

"Evaluar el riesgo de que un sujeto desarrolle una enfermedad o afección" se refiere a la determinación de la posibilidad o probabilidad de que el sujeto desarrolle la enfermedad o afección. Esto se puede expresar como una probabilidad numérica en algunas realizaciones. La evaluación del riesgo se puede realizar en virtud del grado de la disbiosis determinada por los métodos de la invención.

"Enfermedad" se refiere a un estado de alteración patológica en relación con lo normal que puede resultar, por ejemplo, de una infección o una imperfección genética adquirida o congénita.

Una "afección" se refiere a un estado de la mente o el cuerpo de un organismo que no se ha producido a través de una enfermedad reconocida, por ejemplo, la presencia de un agente en el cuerpo, tal como una toxina, un fármaco o un contaminante, o el embarazo.

"Etapa de la misma" se refiere a diferentes estadios de una enfermedad o afección que pueden o no exhibir cambios fisiológicos o metabólicos particulares, pero sí exhiben cambios en el perfil de la microbiota del tracto GI. En algunas realizaciones, las diferencias observadas en el perfil de la microbiota del tracto GI pueden conducir a una clasificación previamente no apreciada del progreso de una enfermedad o afección.

El sujeto puede ser cualquier sujeto humano o animal no humano, pero más particularmente puede ser un vertebrado, por ejemplo, un mamífero, incluidos el ganado y los animales de compañía. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano, en cuyo caso el término "paciente" se puede usar indistintamente con el término "sujeto". El sujeto puede ser de cualquier edad, por ejemplo, un bebé, un niño, un joven, un adolescente o un adulto, preferiblemente un adulto. En los seres humanos, se considera que un adulto tiene al menos 16 años de edad y un bebé hasta los 2 años. En determinadas realizaciones, el sujeto será un bebé, en otras será un niño o un adulto. El sujeto puede tener o ser sospechoso de tener o estar o sospechar de estar en riesgo de disbiosis, o la afección médica en cuestión (por ejemplo, IBS e IBD y sus subcategorías CD y UC).

Un sujeto "normal" o "sano" es un sujeto que no se considera que tenga la enfermedad o dolencia u otra afección médica, cuyo diagnóstico es el objeto del método en cuestión, o una enfermedad, dolencia u otra afección médica que es similar a la misma o comparte características y síntomas comunes, por ejemplo, síntomas y características GI. Un tracto GI "normal" o "sano" es un tracto GI de tales sujetos. Alternativamente poner, un sujeto "normal" o "sano" (o tracto GI) es un sujeto/tracto GI que no tiene disbiosis del tracto GI. En otras realizaciones, un sujeto normal o sano estará esencialmente libre de enfermedad o dolencia grave u otras afecciones médicas, o al menos es un sujeto que no tiene síntomas observables o detectables de ninguna enfermedad o dolencia grave reconocida. En otras realizaciones, un sujeto normal o sano estará libre de toda enfermedad o dolencia u otras afecciones médicas, o al menos no tendrá síntomas observables o detectables de ninguna enfermedad o dolencia reconocida. Preferiblemente, estas referencias a enfermedad, dolencia o afección médica son una referencia a una enfermedad, dolencia o afección médica del tracto GI.

La palabra "correspondiente" se usa para transmitir el concepto de que el sujeto al que se aplica el término es el mismo que otra instancia de ese sujeto. De este modo, las características esenciales que definen a ese sujeto son compartidas por el otro sujeto, aunque los detalles precisos pueden ser únicos. Los términos alternativos podrían ser "coincidencia", "análogo", "de acuerdo", "equivalente" o "igual que".

Los métodos de la invención se pueden realizar en un ordenador, sistema o aparato que lleve un programa adaptado para realizar dichos métodos o al menos una de las etapas de los mismos. De este modo, los métodos de la invención son métodos implementados por ordenador y la invención proporciona además un ordenador, sistema o aparato que lleva un programa adaptado para realizar los métodos de la invención. Por lo general estarán presentes

un procesador para ejecutar el software y un dispositivo de almacenamiento para almacenar los datos de prueba y los resultados de una o más etapas de los métodos de la invención. El procesador y el dispositivo de almacenamiento estarán por lo general en comunicación entre sí. En una realización, el ordenador, sistema o aparato está en comunicación con una red, tal como el internet, por ejemplo, para la comunicación con laboratorios y clínicas que comunican datos de prueba y/o reciben el resultado de los métodos de la invención. El sistema o aparato se puede adaptar además para realizar el perfilado de la microbiota, o una etapa del mismo, por ejemplo, la etapa que da como resultado un perfil de uso de la microbiota de acuerdo con la presente invención, preferiblemente de manera parcial o totalmente automatizada. La invención proporciona además un medio legible por ordenador que lleva dicho programa y dicho programa per se. En otros aspectos más, la invención proporciona las fórmulas I, II y III y el uso de las mismas en los tipos de métodos descritos en general en este documento y los métodos específicos de la invención enumerados en este documento.

Los resultados (salida final) de los métodos de la invención se pueden proporcionar en medios informáticos o legibles por humanos o comunicarse por cualquier medio apropiado, electrónico o de otro tipo, para su comprensión y/o interpretación adicional por parte de un experto.

Los métodos de la invención se pueden usar solos como una alternativa a otras técnicas de investigación o además de tales técnicas para proporcionar información sobre los perfiles de la microbiota de un sujeto, por ejemplo, en el diagnóstico, etc. De enfermedades y afecciones asociadas con perturbaciones en la microbiota del tracto GI, en particular para diagnosticar IBS o descartar IBS como explicación de los síntomas presentados por el sujeto. En el contexto del diagnóstico de IBS, por ejemplo, los métodos de la invención se pueden usar como una medida de diagnóstico alternativa o adicional al diagnóstico usando técnicas de imagen tales como la formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), imágenes por ultrasonido, imágenes nucleares, imágenes de rayos X o endoscopia o marcadores serológicos de IBD, por ejemplo, anticuerpos anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA) y anticuerpos de citoplasma de antineutrófilos perinucleares (pANCA).

En los métodos descritos anteriormente se puede combinar con el tratamiento terapéutico de dicho sujeto de manera consistente con el diagnóstico o pronóstico realizado para aliviar, reducir, remediar o modificar al menos un síntoma o característica de la enfermedad o afección asociada con perturbaciones en la microbiota del tracto GI que tiene el sujeto (por ejemplo, IBS, etc.), por ejemplo, mediante la administración de una composición farmacéutica (que se puede considerar que incluye trasplantes microbotaes fecales y cultivos microbianos) y/o realizando un procedimiento quirúrgico apropiado para tratar la enfermedad o afección y/o ajustar el estilo de vida del sujeto de una manera apropiada para tratar la enfermedad o afección. En este sentido, la invención se puede considerar aplicada en el contexto de métodos para el tratamiento terapéutico de enfermedades o afecciones asociadas con perturbaciones en la microbiota del tracto GI (por ejemplo, IBS, etc.) y para guiar y/u optimizar tales tratamientos. Esto puede incluir tratamientos para remediar, o al menos abordar en parte, la disbiosis del tracto GI de un sujeto o el grado de la misma.

La figura 1 muestra la distribución de las puntuaciones de DI 1-5 para la cohorte de validación determinada en el ejemplo 1, que muestra el aumento de DI de individuos normales a través de pacientes con IBS y finalmente en pacientes con IBD.

La figura 2 muestra las puntuaciones de PCA para los dos primeros componentes principales para la cohorte de validación (n = 287) en base a 54 sondas. Los dos PC representan el 48 % de la variación y los puntos están coloreados según A) cohorte: amarillo - normal, azul - IBS y rojo - IBD; y B) DI: gris = 1-2, naranja = 3, rojo = 4, rojo oscuro = 5.

La figura 3 muestra la señal normalizada media para las cinco sondas principales clasificadas por diferencia relativa absoluta entre disbióticos (rojo) y no disbióticos (gris) como se determina en el ejemplo 1 para A) pacientes con IBS (n = 109) y B) pacientes con IBD (n = 135). Act; Actinobacteria, B/Prev; Bacteroides/Prevotella, Firm(b); Firmicutes (Bacilli), Firm(c); Firmicutes (Clostridia), F. prau; *Faecalibacterium prausnitzii*, Pb; Proteobacteria, Rum.g; Ruminococcus gnavus, Sh/Es; *Shigella/Escherichia*.

La figura 4 muestra la señal normalizada media para las sondas clasificadas por diferencia relativa absoluta entre disbiótico (rojo) y no disbiótico (gris) como se determina en el ejemplo 1 para la cohorte española (n = 24). Bf; Bifidobacterium, B.ster; Bacteroides stercoris, Parab; Parabacteroides, Pb; Proteobacterias, Sh/Es; *Shigella/Escherichia*.

La figura 5 muestra las puntuaciones de los tres primeros componentes principales del PCA de los datos normalizados de cinco sujetos sanos recopilados semanalmente durante un máximo de 14 semanas (n = 64). Un punto es una muestra del donante x tomada en el momento y. Los primeros tres PC representan el 65 % de la variación y los puntos están coloreados según el donante.

Ejemplo 1 - Preparación de perfiles de la microbiota del tracto GI con 54 sondas dirigidas a una pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos y usarlos para determinar la disbiosis en pacientes con IBS e IBD

## Materiales y métodos

## Muestras humanas

5 Se recogieron muestras fecales de 668 adultos (de 17-76 años; 69 % mujeres), incluidos individuos normales (n = 297) y pacientes con IBS (n = 236) e IBD (n = 135) (Tabla 1). Se recolectaron muestras fecales de hospitales en Noruega, Suecia, Dinamarca y España (72 %), así como de lugares de trabajo en Oslo, Noruega (28 %), en un esfuerzo por lograr la heterogeneidad. Los donantes normales no presentaban signos clínicos, síntomas o antecedentes de IBD, IBS u otros trastornos orgánicos relacionados con el tubo digestivo (por ejemplo, cáncer de colon). Las muestras de IBS se recolectaron como parte de estudios prospectivos que usaron los criterios de diagnóstico de Roma III para identificar el IBS. La distribución de los subtipos de IBS fue 44 % IBS-diarrea, 22 % IBS-alternancia, 17 % IBS-estreñimiento, 11 % IBS-sin subtipo y 4 % IBS-mixto. El diagnóstico de IBD se basó en la presentación clínica confirmada por colonoscopia. De las 135 muestras de IBD, 80 (59 %) eran tratamiento-pacientes naive y 55 (41 %) eran pacientes con IBD en remisión. La distribución de los tipos de IBD fue 62 % de UC y 38 % de CD para el grupo tratamiento-naive, y 67 % de UC y 33 % de CD para el grupo de IBD en remisión. Se obtuvo el consentimiento informado para todas las muestras junto con la aprobación de los comités de ética científica locales.

Tabla 1. Información demográfica

categorías	Total	Mujeres, %	Edad (años)*	
			Media	Intervalo
Controles normales	297	63	41	21-70
Nórdico	254	64	42	21-70
Danés	19	63	42	23-61
Español	24	50	35	22-56
IBS†	236	78	40	17-76
IBS-D	102	79	40	18-70
IBS-C	41	85	42	22-73
IBS-M	10	80	37	19-55
IBS-U	25	88	41	19-68
IBS-A	51	67	39	20-62
IBD tratamiento-naive	80	56	34	18-61
CD	30	50	33	19-53
UC	50	63	35	18-61
Remisión de IBD‡	55	76	42	20-69
CD	18	72	38	20-59
UC	36	78	44	24-69

A, alternante; C, estreñimiento; CD, enfermedad de Crohn; D, diarrea; IBS, síndrome del intestino irritable; IBD, enfermedad inflamatoria intestinal; M, mixto; U, sin subtipo; UC, colitis ulcerosa.

\* Se conocieron edades precisas para el 99 % del total de muestras usadas.

† Tipo de IBS conocido por el 97 % del total de muestras de IBS usadas.

‡ Diagnóstico de CD/UC conocido para el 99 % del total de muestras de IBD usadas

20

## Colección de muestra

Las muestras se recogieron en el hogar, la oficina o el hospital y se congelaron en 3-5 días. Las muestras fecales se mezclaron con solución reguladora de recuperación y transporte de heces (Roche, Basilea, Suiza) en una proporción de 1:3 mediante agitación con vórtex. Todas las muestras se centrifugaron por pulsos y se transfirieron 600 µl a un bastidor Lysing Matrix E de 96 pocillos (MP Biomedicals Inc., Santa Ana, CA, EE. UU.). Las muestras se sometieron a lisis mecánicamente dos veces a 1800 rpm, 40 s en reposo de 40 s, en un FastPrep-96™ (MP Biomedicals Inc.). Las muestras lisadas se centrifugaron (5 min, 1300 g, centrífuga PlateSpin II, Kubota, Tokio, Japón) y se incubaron 250 µl a 65 °C, durante 15 min con 250 µl de solución reguladora de lisis BLM y 20 µl de proteasa. Se usó una alícuota de 400 µl de cada muestra fecal tratada con proteasa para extraer el ADN genómico total según las instrucciones del kit mag™ maxi (LGC Genomics, Berlín, Alemania), ajustado para un robot de extracción de ADN MagMAX™ express 96 (Life Technologies, Waltham, MA, EE.UU.).

Los cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (dirigidos al gen de ARNr 16S y se usaron para amplificar fragmentos de 1180 pares de bases que contienen siete regiones variables (V3-V9). A esto le siguió una limpieza de la reacción como se describe en Vebø et al (Vebo HC, Sekelja M, Nestestog R, et al. Temporal

development of the infant gut microbiota in immunoglobulin E-sensitized and nonsensitized children determined by the GA-map infant array. Clin Vaccine Immunol 2011; 18: 1326-1335) con modificaciones menores.

Análisis de muestras: SNE, hibridación y detección

5 La plantilla de PCR (> 75 ng) se usó en una reacción de extensión de un solo nucleótido (SNE) descrita en Vebø et al, con las siguientes modificaciones: un volumen final de 25 µl que contenía BIOTIN-11-ddCTP 0.5 µM (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE. UU.) se usó en cinco ciclos de marcaje para marcar un conjunto de sondas de 55 sondas (0.01 µM) (54 sondas diana de bacterias y control universal). Se hibridaron sondas complementarias acopladas a microesferas magnéticas con código de barras carboxilo (BMB, Applied BioCode, Santa Fe Springs, CA, EE. UU.) con las sondas SNE y se cuantificaron usando un analizador BioCode 1000A (Applied BioCode). En resumen, se agregó una muestra de SNE de 10 µl a un volumen de reacción de 40 µl que contenía 31.2 µl de solución reguladora BMB, control de hibridación y 1.8 µl de BMB acopladas. Las muestras se incubaron a 700 rpm, 95 °C, durante 3 min, seguido de 700 rpm, 45 °C, durante 15 min en un Vortemp™ 56 (Labnet International Inc., Edison, NJ, EE. UU.). Se agregó una solución reguladora de BMB de 25 µl que contenía 20 µg/ml de reactivo ultrasensible de estreptavidina R-ficoeritrina LumiGrade (Roche) a cada muestra antes de 90 minutos de incubación a 700 rpm, 45 °C. Finalmente, las muestras se lavaron de acuerdo con las recomendaciones de Applied BioCode. La señal de hibridación fue procesada por el software BioCode 1000A Analyzer (Applied BioCode). El software identificó y cuantificó las señales medianas, el recuento de microesferas y las banderas, y los archivos de datos sin procesar se exportaron para su posterior análisis.

Identificación, selección de sondas, pruebas *in silico* e *in vitro*

25 Para establecer y optimizar el conjunto de sondas bacterianas más aplicable, se recopilaron datos de investigaciones previas sobre la microbiota intestinal de IBD e IBS en base a criterios de búsqueda predefinidos para proporcionar > 500 observaciones bacterianas asociadas con la aparición de IBD e IBS. A partir de un conjunto de datos combinado de 496 secuencias de genes de ARNr 16S (secuencia[s] de consenso para cada especie, elegidas entre todas las secuencias largas de ARNr 16S disponibles y purificadas para evitar errores de secuencia) de 269 especies bacterianas, se diseñaron sondas para cubrir las principales observaciones bacterianas realizadas a partir de la literatura. Todas las sondas se diseñaron de acuerdo con Vebø et al con una temperatura de fusión mínima (T<sub>m</sub>) de 60 °C mediante el método del vecino más cercano para el grupo diana donde el extremo 3' del nucleótido de la sonda es una citosina; los requisitos de la sonda del grupo no diana fueron una T<sub>m</sub> de 30 °C o la ausencia de una citosina como nucleótido adyacente al extremo 3' de la sonda. Cada sonda se diseñó para apuntar a una especie o grupo bacteriano, esto es, *Faecalibacterium prausnitzii* (especie), Lactobacillus (género), Clostridia (clase) y Proteobacteria (filo), en base a su secuencia de ARNr 16S (V3-V9). Las sondas que satisfacían la detección de la diana y la exclusión no diana *in silico* se evaluaron para el etiquetado cruzado, el autoetiquetado y la hibridación cruzada antes de realizar la validación final contra cepas bacterianas *in vitro*.

40 Después de las pruebas *in vitro*, se seleccionó adicionalmente un panel de 124 sondas óptimas usando métodos de selección de variables: importancia variable en la proyección, proporción de selectividad y mínimos cuadrados parciales de intervalo usando datos de una selección de muestras normales y de IBS (datos no mostrados). Las variables (sondas) se seleccionaron en base a su capacidad para distinguir entre muestras aisladas de individuos sanos normales y pacientes con IBS. Se seleccionó un panel final de 54 sondas que cubrían los sitios a través de V3 a V7 en la secuencia de ARNr 16S. Se realizó la especificidad de la diana bacteriana, probada con el conjunto de 54 sondas contra 368 cepas bacterianas individuales para definir las bacterias diana para cada sonda. Como se muestra en la tabla 2, las sondas detectan bacterias dentro de los seis filios; Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Tenericutes y Verrucomicrobia, que cubren 11 clases bacterianas taxonómicas y 36 géneros.

Tabla 2: Lista de las dianas bacterianas de las 54 sondas de marcaje

Número de sonda	Filo	Clase	Género
1	Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Atopobium</i>
2	Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Bifidobacterium</i>
3	Actinobacteria	Actinobacteria	
4	Actinobacteria		
5	Bacteroidetes	Bacteroidia	<i>Alistipes</i>
6	Bacteroidetes	Bacteroidia	<i>Alistipes</i>
7	Bacteroidetes	Bacteroidia	<i>Bacteroides</i>
8	Bacteroidetes	Bacteroidia	<i>Bacteroides</i>
9	Bacteroidetes	Bacteroidia	<i>Bacteroides/ Prevotella</i>

ES 2 881 280 T3

(continuación)

Número de sonda	Filo	Clase	Género
10	Bacteroidetes	Bacteroidia	<i>Bacteroides</i>
11	Bacteroidetes	Bacteroidia	<i>Bacteroides</i>
12	Bacteroidetes	Bacteroidia	<i>Bacteroides</i>
13	Bacteroidetes	Bacteroidia	<i>Parabacteroides</i>
14	Bacteroidetes	Bacteroidia	<i>Parabacteroides</i>
15	Bacteroidetes	Bacteroidia	<i>Prevotella</i>
16	Firmicutes	Bacilli	<i>Bacillus</i>
17	Firmicutes	Bacilli	<i>Lactobacillus</i>
18	Firmicutes	Bacilli	<i>Lactobacillus</i>
19	Firmicutes	Bacilli	<i>Pedococcus/Lactobacillus</i>
20	Firmicutes	Bacilli	<i>Streptococcus</i>
21	Firmicutes	Bacilli	<i>Streptococcus</i>
22	Firmicutes	Bacilli	<i>Streptococcus</i>
23	Firmicutes	Bacilli	<i>Streptococcus</i>
24	Firmicutes	Bacilli	
25	Firmicutes	Bacilli/ Clostridia	<i>Streptococcus/Eubacterium</i>
26	Firmicutes	Clostridia	<i>Anaerotruncus</i>
27	Firmicutes	Clostridia	<i>Blautia</i>
28	Firmicutes	Clostridia	<i>Clostridium</i>
29	Firmicutes	Clostridia	<i>Clostridium</i>
30	Firmicutes	Clostridia	<i>Desulfitispora</i>
31	Firmicutes	Clostridia	<i>Dorea</i>
32	Firmicutes	Clostridia	<i>Eubacterium</i>
33	Firmicutes	Clostridia	<i>Eubacterium</i>
34	Firmicutes	Clostridia	<i>Eubacterium</i>
35	Firmicutes	Clostridia	<i>Faecalibacterium</i>
36	Firmicutes	Clostridia	<i>Ruminococcus</i>
37	Firmicutes	Clostridia	
38	Firmicutes	Clostridia	
39	Firmicutes	Erysipelotrichia	<i>Catenibacterium</i>
40	Firmicutes	Erysipelotrichia	<i>Coprobacillus</i>
41	Firmicutes	Erysipelotrichia	Erysipelotrichaceae sin clasificar
42	Firmicutes	Negativicutes	<i>Dialister</i>
43	Firmicutes	Negativicutes	<i>Megasphaera/Dialister</i>
44	Firmicutes	Negativicutes	<i>Phascolarctobacterium</i>
45	Firmicutes	Negativicutes	
46	Firmicutes	Negativicutes/Epsilonproteobacteria/Clostridia	<i>Veillonella/Helicobacter</i>
47	Especies Firmicutes/Tenericutes/Bacteroidetes		
48	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Acinetobacter</i>
49	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>
50	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Salmonella, Citrobacter, Cronobacter, Enterobacter</i>
51	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Shigella/Escherichia</i>
52	Proteobacteria		
53	Tenericutes	Mollicutes	<i>Mycoplasma</i>
54	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	<i>Akkermansia</i>

Procesamiento previo de los datos

Para asegurar una alta calidad, se aplicaron varios criterios de control de calidad a los datos de detección para cada muestra: 1) un recuento de microesferas > 2 para cada sonda; 2) la señal mediana del control de hibridación (HYC) > 13,000; 3) una señal de fondo mediana < 500; y 4) una señal mediana de control universal > 4500. La normalización se aplicó dividiendo primero la intensidad de la señal de cada sonda en cada muestra por la intensidad de la señal para HYC para esa muestra y multiplicándola por 1000. Esto se hizo para ajustar las diferencias de muestra debidas al pipeteo o hibridación. Posteriormente, se aplicó la normalización para ajustar las diferencias de ejecución dividiendo la señal normalizada por HYC de cada sonda en cada muestra por la señal normalizada por HYC mediana de cada sonda para las réplicas de un control de ADN sintético y multiplicando por 1000. Antes de la calibración del perfil de la microbiota normobiótica, las intensidades de señal normalizadas por debajo de 15 se establecieron en 0 para eliminar el ruido de fondo bajo y los datos se centraron en la media. Las muestras de prueba y validación se normalizaron, y las señales normalizadas por debajo de 15 se establecieron en 0 antes de que los datos se centraran en la media usando señales de sonda medias de la cohorte de referencia normobiótica.

Desarrollo y validación de pruebas de disbiosis

Se usó el análisis de componentes principales (PCA) para construir un perfil de la microbiota normobiótica (modelo). El límite entre no disbiótico y disbiótico se determinó calculando las regiones de confianza para los valores de las estadísticas de Q y cuadrado de T de Hotelling dadas por las puntuaciones de PCA en el modelo. Geométricamente esto corresponde a un rectángulo con una esquina ubicada en el origen que clasifica las muestras ubicadas dentro del rectángulo como no disbióticas y las muestras ubicadas afuera como disbióticas. El análisis de las estadísticas de Q y cuadrado de T escaladas por el límite de confianza mostró que la distancia euclidiana desde el origen tenía una distribución similar a logaritmo normal (datos no mostrados). Se usó la distancia euclidiana desde el origen para fusionar las dos dimensiones, y se realizó una ponderación para capturar el efecto de las estadísticas de Q y cuadrado de T según fuera apropiado. Una única representación numérica del grado de disbiosis, definida como el índice de disbiosis (DI), se derivó de una distribución logarítmica normal asignando porciones estimadas de la distribución a diferentes valores en una escala establecida de 0-5. Un valor de DI de 2 se definió como una separación de clases representada por los límites de confianza identificados; siendo un DI de 2 o menor la región no disbiótica y un DI de 3 o mayor la región disbiótica. Cuanto mayor sea el DI por encima de 2, más se considera que la muestra se desvía de la normobiosis, por ejemplo, la muestra A con DI = 4 está más alejada de la cohorte de referencia normobiótica en el espacio euclidiano que la muestra B con DI = 3, de este modo A es más disbiótica que B. La escala se optimizó con énfasis en reducir la variación técnica entre réplicas, lo que significa que la parte entera de la salida numérica se decide por niveles predeterminados de la distancia euclidiana.

Para crear la presente prueba, se seleccionaron 211 individuos normales y se dividieron aleatoriamente en un conjunto de entrenamiento (n = 165) diseñado para construir modelos y un conjunto de prueba (n = 46) diseñado para ajustar parámetros. Se analizaron muestras duplicadas y se usó la señal normalizada media para el entrenamiento y las pruebas. Los datos demográficos de la muestra para los dos grupos fueron similares (Tabla 3). Además, se incluyó un conjunto de pacientes con IBS en el conjunto de prueba (n = 127). Se desarrollaron y evaluaron un número de modelos, y la frecuencia de disbiosis en el conjunto de prueba se usó como medida del rendimiento del modelo. Para el modelo final de PCA, se usaron 15 componentes principales y se determinó un límite de confianza del 98 % para las estadísticas de Q y cuadrado de T para definir la separación de clases. Cuando el modelo se usa para puntuar otras muestras, los valores fuera de estos límites se definen como disbióticos.

Tabla 3. Conjuntos de muestra usados para el desarrollo y la validación de pruebas

Cohorte	Muestras, n	Tipo de muestra, n				
		Edad, media	Mujeres, %	Normal	IBS	IBD
Entrenamiento	165	42	64	165	-	-
Prueba	173	40	73	46	127	-
Validación	287	39	71	43	109	135
Cohorte completa	625	40	70	254	236	135

Se usó validación externa usando un conjunto de prueba independiente que comprende sujetos normales, IBS e IBD (n = 287) para evaluar el rendimiento de diagnóstico clínico del modelo (Tabla 4). Los sujetos del conjunto de validación eran todos de donantes únicos que no se habían incluido en la población de referencia normal usada para la calibración del perfil normobiótico o en el ajuste de parámetros. Cada muestra se procesó usando el algoritmo finalizado que convierte los datos de cada muestra en un solo entero, esto es, el DI, que representa el grado de disbiosis en base a la abundancia y el perfil bacteriano dentro de una muestra en relación con el perfil normobiótico establecido. Un DI > 2 representa una desviación potencialmente relevante en el perfil microbiótico del de la población de referencia normobiótica. Finalmente, se calculó la frecuencia de la disbiosis. Además, se realizó PCA en el conjunto de validación para investigar las diferencias en el perfil de la microbiota entre los tres grupos de sujetos.

Tabla 4. Porcentaje de disbiosis y puntuación DI media en la cohorte de validación

Cohorte	Total	Disbiótico, % (95 % CI)	DI, media
Controles normales	43	16 ( $\pm 11$ )	1.72
IBS	109	73 ( $\pm 8$ )	2.98
IBS-D	34	76 ( $\pm 14$ )	3.03
IBS-C	26	73 ( $\pm 17$ )	3.00
IBS-M	3	67	3.33
IBS-U	25	72 ( $\pm 18$ )	3.04
IBS-A	20	70 ( $\pm 20$ )	2.85
IBD tratamiento-naive	80	70 ( $\pm 10$ )	3.31
CD	30	80 ( $\pm 14$ )	3.60
UC	50	64 ( $\pm 13$ )	3.14
Remisión de IBD	55	80 ( $\pm 11$ )	3.15
CD	18	89 ( $\pm 14$ )	3.65
UC	36	75 ( $\pm 14$ )	2.92

A, alternante; C, estreñimiento; CD, enfermedad de Crohn; D, diarrea; LI, índice de disbiosis; IBD, enfermedad inflamatoria intestinal; IBS, síndrome del intestino irritable; M, mixto; U, sin subtipo; UC, colitis ulcerosa.

## 5 Rendimiento técnico

Se siguió la directiva de la EU para pruebas de diagnóstico in vitro para asegurar el cumplimiento de una prueba con marca CE. Los principales parámetros técnicos evaluados fueron precisión e intervalo cuantitativo de la prueba; tanto a nivel de señal de sonda como a nivel de salida final (esto es, DI). A nivel de la sonda, la precisión de las señales (coeficiente de variación [CV], porcentaje) varió con la intensidad de la señal sin procesar. Las señales por debajo de 500 IU se consideraron ruido de fondo; por lo tanto, la medición de la varianza no fue aplicable. Para señales superiores a 500 IU, se estimó que la precisión era del 8.4 %, usando ciclos repetidos para seis donantes durante seis extracciones fecales por donante durante 2 días (n = 328). Un CV por debajo del 10 % se estableció como criterio en el desarrollo del algoritmo DI. Sobre la base de mediciones repetidas de 139 muestras disbióticas, el 94 % de las muestras mostraron CV por debajo del 10 %. Además, se evaluaron varias etapas de prueba en proceso (datos no mostrados).

### Variación de la microbiota fecal a lo largo del tiempo

Se investigó la variación en la microbiota a lo largo del tiempo tanto para datos normalizados en el conjunto de sondas seleccionado como para el resultado de la prueba (DI). Se recolectaron muestras fecales de cinco donantes (de 24 a 38 años; 80 % mujeres) en un intervalo de 1 semana hasta por 14 semanas. Se realizó un PCA de datos normalizados y se realizó una evaluación estadística de la variación en las señales para el donante y el tiempo de muestreo (semanal) usando el paquete R *ffmanova*, una implementación del análisis de varianza multivariante cincuenta y cincuenta (ANOVA).

### Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron en GA (Genetic Analysis AS, Oslo, Noruega). Los datos categóricos se expresaron como el número de sujetos (y porcentaje) con una condición específica o variable clínica, y la media según corresponda. Se usó la prueba U de Mann-Whitney para probar los valores de DI. Todas las pruebas fueron bilaterales y el nivel de significancia elegido fue  $P < 0.05$ . El análisis se realizó usando el lenguaje de cálculo estadístico R versión 3.0.2 y MATLAB 2011b, The Math-Works, Inc., Natick, Massachusetts, Estados Unidos.

## 35 Resultados

### Frecuencia de disbiosis en sujetos normales, con IBS y con IBD

La validación de la prueba descrita a continuación se realizó comparando la frecuencia de disbiosis en un conjunto de 287 muestras, incluidos individuos normales no incluidos previamente en la calibración del perfil normobiótico (n = 43) y pacientes con IBS (n = 109) e IBD (n = 135) (Tabla 3). Los resultados de la cohorte de validación se muestran en la tabla 4. De las 43 muestras normales incluidas en la cohorte de validación, siete (16 %) se determinaron como disbióticas, y la distribución de las puntuaciones de DI para la cohorte de validación se muestra en la figura 1. Entre los pacientes con IBS, se determinó que 80 de 109 (73 %) eran disbióticos. En la cohorte de IBD, se determinó que 100 de 135 (74 %) eran disbióticos, incluidos 56 de 80 (70 %) pacientes con IBD de tratamiento-naive y 44 de 55 (80 %) pacientes con IBD en remisión clínica. La distribución de DI entre los pacientes con IBS e IBD fue

significativamente diferente ( $P < 0.01$ ). La figura 1 sugiere que la distribución de las puntuaciones de DI para la cohorte de IBD muestra un cambio mayor hacia valores más altos que el IBS. De manera similar, dentro de ambas cohortes de IBD, la frecuencia de disbiosis para la CD (80 % y 89 %, respectivamente) fue mayor que la de la UC (64 % y 75 %), con una diferencia significativa en los valores de DI entre la CD y la UC ( $P = 0.03$ ).

La prueba también se aplicó a un conjunto de 43 muestras disponibles de individuos normales de Dinamarca ( $n = 19$ ; 23-61 años; 63 % mujeres) y España ( $n = 24$ ; 22-56 años; 50 % mujeres). Se determinó que siete de las 19 muestras danesas eran disbióticas con un DI media de 2.16, lo que resultó en un 37 % de disbióticos (CI del 95 %, 15 % -59 %). Entre las muestras españolas, se determinó que 10 de las 24 eran disbióticas con un DI media de 2.58, lo que resultó en un 42 % de disbióticos (intervalo de confianza [CI] del 95 %, 22 %-62 %). Si bien los resultados para la cohorte normal danesa no fueron significativamente diferentes de la cohorte de validación normal ( $P > 0.05$ ), observamos que el 50 % (5/10) de las muestras disbióticas en la cohorte española mostraron un DI superior a 3.

#### Perfil bacteriano en disbiosis

La aplicación de PCA a la cohorte de validación usando datos normalizados para las 54 sondas demostró un agrupamiento relativo de muestras por cohortes de enfermedades. Las puntuaciones de los dos primeros componentes principales (PC), que representan el 48 % de la varianza en los datos, mostraron un grupo más ajustado para los sujetos normales en la esquina inferior derecha en comparación con una distribución más diversa para los sujetos con IBD e IBS (Figura 2A). Se encontró que la distribución de la muestra en el gráfico de puntuaciones estaba relacionada con el grado de disbiosis, con un grupo central de muestras no disbióticas rodeadas por muestras con disbiosis 'débil' (DI = 3) y las muestras con la disbiosis más 'severa' (DI = 5) dispersas fuera de este grupo (Figura 2B). Tanto el primer como el segundo componente principal separan cada uno las muestras normales de las muestras de IBS e IBD hasta cierto punto. La dispersión de los valores de DI implica que diferentes bacterias dominan la disbiosis para diferentes muestras. Para investigar más a fondo qué grupos de bacterias fueron los principales contribuyentes a la disbiosis en IBD e IBS, se calcularon las diferencias en la señal normalizada media general entre el estado disbiótico y no disbiótico para cada una de las 54 sondas. Las bacterias predominantes que contribuyeron a la disbiosis dentro de la cohorte de IBS fueron Firmicutes (Bacilli), Proteobacteria (*Shigella/Escherichia*), Actinobacteria y *Ruminococcus gnavus* (Figura 3A). De manera similar, las bacterias predominantes dentro de la cohorte de IBD fueron Proteobacteria (*Shigella/Escherichia*), Firmicutes, específicamente *Faecalibacterium prausnitzii* y Bacteroidetes (Bacteroides y Prevotella) (Figura 3B). Curiosamente, las proteobacterias (*Shigella/Escherichia*) se encontraban entre los cinco principales grupos bacterianos que contribuyen a la disbiosis tanto para el IBS como para la IBD, lo que implica similitudes en la disbiosis entre el IBS y la IBD. Sin embargo, todos los grupos bacterianos que más contribuyeron a la disbiosis en la cohorte de IBS mostraron una mayor intensidad de la señal de la sonda en comparación con los pacientes no disbióticos, mientras que para la cohorte de la IBD, tanto la intensidad de la señal de la sonda reducida (*F. prausnitzii*) como la aumentada fueron los principales contribuyentes a la disbiosis.

Se encontró una única sonda con una señal diferencial entre las muestras de las cohortes española y escandinava ( $P < 0.01$ ; corrección de Benjamini-Hochberg). La sonda se dirige a Firmicutes (*Streptococcus*), y se encontró que esta señal estaba elevada en las muestras españolas en comparación con la cohorte escandinava. La figura 4 muestra las bacterias predominantes que contribuyen a la disbiosis en las muestras españolas. Como era de esperar, se encontró nuevamente que las proteobacterias (*Shigella/Escherichia*) son una bacteria que contribuye a la disbiosis. Además, *Bacteroides stercoris* y *Bifidobacterium* contribuyen a la disbiosis, que potencialmente podría estar relacionada con diferencias por ejemplo, en dieta entre los países escandinavos y la región mediterránea.

#### Variación de la microbiota fecal a lo largo del tiempo

Se recogieron muestras fecales de cinco individuos a intervalos de 1 semana durante hasta 14 semanas. El PCA de los datos normalizados ( $n = 64$ ) reveló que la mayor parte de la variabilidad en el análisis longitudinal de la microbiota fecal estaba relacionada con la variabilidad interindividual; los donantes se pueden distinguir claramente por los tres primeros y más importantes PC en el gráfico de puntuación (Figura 5). En este estudio, las muestras se agruparon según el donante fecal independientemente del tiempo de recolección de la muestra. Los tres primeros PC describieron el 65 % de la variabilidad total en los datos de la microbiota fecal.

La significación de los PC fue analizada por *ffmanova* usando datos normalizados y solo se incluyeron en el modelo los efectos principales del donante y el tiempo de muestreo (semanal). Los resultados muestran que la cantidad promedio de variación entre donantes fue mayor que dentro de un donante ( $P < 0.001$ ) con varianzas explicadas en base a sumas de cuadrados de 0.48. La variación entre el tiempo de muestreo no fue significativa ( $P = 0.26$ ), con varianzas explicadas en base a sumas de cuadrados de 0.11. El bajo nivel de variación dentro de un individuo a lo largo del tiempo es crucial para usar la prueba para controlar los cambios durante el tratamiento con el fin de alterar el perfil de la microbiota.

#### Discusión

En este ejemplo, se demuestra el rendimiento de una nueva prueba de microbiota intestinal, cuyo objetivo es identificar y caracterizar la disbiosis determinando la desviación de la normobiosis. Dicho enfoque de diagnóstico

contrasta con el diagnóstico directo de una enfermedad en particular. Se requieren conjuntos característicos de bacterias en una microbiota intestinal normobiótica sana, y la desviación representará un estado disbiótico. La medición cuantitativa de la desviación en la microbiota bacteriana permite caracterizar la disbiosis en muestras de pacientes con IBS e IBD en base a un algoritmo de diagnóstico único dirigido a la normobiosis.

5 La presente prueba es un método de amplio espectro, reproducible, preciso, de alto rendimiento y fácil de usar para cuantificar el grado de disbiosis que es especialmente apropiado para uso clínico. Esta prueba proporciona un DI derivado algorítmicamente en base a la abundancia y el perfil de bacterias dentro de una muestra. Este DI es un indicador del grado en el que el microbioma de un individuo se desvía del de una población de referencia normal y podría ser potencialmente muy relevante en el diagnóstico clínico y el control de la progresión de afecciones tales como la IBD y el IBS. La estabilidad de la microbiota intestinal humana es otra característica importante si la caracterización microbiana ha de desempeñar un papel en el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de enfermedades. Se ha demostrado que, en la microbiota de un individuo, el 60% de las cepas bacterianas persistieron en el transcurso de 5 años. En nuestro estudio correspondiente, encontramos solo una baja variación intraindividual en el muestreo semanal durante 14 semanas.

La prueba descrita actualmente se ha usado para detectar alta frecuencia de disbiosis en pacientes con IBS e IBD y baja frecuencia en individuos normales. Tanto los pacientes con IBD en remisión como los pacientes con IBD tratamiento-naive informaron puntuaciones de DI muy por encima del umbral de 2 con una frecuencia de disbiosis del 80 % y 70 %, respectivamente. Los pacientes con IBS diagnosticados con Roma III mostraron una frecuencia del 73 %, lo que confirma observaciones previas, mientras que la frecuencia en individuos normales fue del 16 %.

La disbiosis está asociada con muchas enfermedades, incluido el IBS, diferentes formas de IBD, obesidad y diabetes, y también se ha relacionado con la depresión y el autismo. En los últimos años, han surgido nuevas opciones de tratamiento con respecto a restablecer el equilibrio de la microbiota en pacientes disbióticos. El FMT ahora se considera el tratamiento más eficaz en la colitis recidivante por *Clostridium difficile* y actualmente se está estudiando en ensayos clínicos de fase I a IV en muchas de las afecciones mencionadas anteriormente (CD, fase II/III NCT01793831; UC, fase I NCT01947101, fase II NCT01896635, fase II/III NCT01790061; IBD incluyendo CD y UC, fase IV NCT02033408).

Una barrera clave en la interpretación de los datos de FMT ha sido la variabilidad en la composición bacteriana de la microbiota del donante, no solo relacionada con los organismos patógenos sino también con la composición de la microflora que ocurre normalmente, destacando además la importancia de identificar un método para caracterizar suficientemente microbios tanto patógenos como no patógenos. La capacidad de caracterizar el microbioma de un individuo y controlar las alteraciones puede permitir la predicción del resultado terapéutico o incluso la recaída en tales condiciones. También puede ayudar a explicar por qué un paciente es refractario a determinados regímenes terapéuticos y facilitar la adaptación del régimen de acuerdo con lo anterior. Además, los perfiles bacterianos detallados rápidos y reproducibles de individuos normobióticos y disbióticos pueden ayudar a la continuación de enfoques terapéuticos innovadores tales como FMT. De este modo, el uso de la prueba podría resultar clínicamente útil para determinar la disbiosis, no solo en pacientes con IBS e IBD, sino también en otras afecciones en las que el conocimiento sobre el perfil de la microbiota podría resultar clínicamente útil, en el control posterior de los regímenes de tratamiento prescritos y en la evolución de nuevos enfoques terapéuticos.

Ejemplo 2 – Análisis representativo de una muestra usando 54 sondas dirigidas a una pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos

Tabla 5: Señales medidas para 54 sondas de prueba y 4 sondas de control (negrita)

Sonda	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Señal medida	1187	41	4411	2198	9	10	89	38	50	1691
Sonda	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Señal medida	1358	27	60	303	4330	26	26	250	44	885
Sonda	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Señal medida	1369	7	68	65	49	24	10	32	45	67
Sonda	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
Señal medida	2676	798	17	2	2	528	32	203	1	529
Sonda	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49

(continuación)

# ES 2 881 280 T3

Señal medida	765	38	97	183	120	8	5068	4548	4	47
Sonda	50	103	104	105	106	107	126	127		
Señal medida	1	155	419	11	81	19.352	4	6		

Tabla 6: Señales medidas ajustadas por la sonda de control de hibridación (107) - valores de prueba divididos por el valor de la sonda 107.

Sonda	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Datos ajustados por Hib.	61.33732947	2.118644068	227.9350971	113.5799917	0.46506821	0.516742456	4.599007854	1.963621331	2.583712278	87.38114924
Sonda	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Datos ajustados por Hib.	70.17362547	1.39520463	3.100454733	15.6572964	223.7494833	1.343530384	1.343530384	12.91856139	2.273666804	45.73170732
Sonda	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Datos ajustados por Hib.	70.74204217	0.361719719	3.513848698	3.358825961	2.532038032	1.240181893	0.516742456	1.653575858	2.32534105	3.462174452
Probe	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
Hyb adjusted data	138.2802811	41.23604795	0.878462174	0.103348491	0.103348491	27.28400165	1.653575858	10.48987185	0.051674246	27.3356759
Sonda	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
Datos ajustados por Hib.	39.53079785	1.963621331	5.012401819	9.456386937	6.200909467	0.413383964	261.8850765	235.0144688	0.206696982	2.428689541
Sonda	50	103	104	105						
Datos ajustados por Hib.	0.051674246	8.009508061	21.65150889	0.568416701						

Tabla 7: Conjunto de datos tras normalización

Sonda	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Datos normalizados	39.90146827	2.049095604	226.4348805	110.1761624	1.053325259	0.434377731	5.013782072	1.776521563	4.335974759	55.75664619
Sonda	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Datos normalizados	46.20320406	1.067156835	2.956232674	14.28966269	164.7199777	1.69062125	1.752980721	12.71695229	1.494773273	38.19827022
Sonda	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Datos normalizados	45.59413493	0.302402828	2.96922674	3.293599131	2.274834376	0.996537623	0.346558113	1.066689323	1.431661161	2.368829251
Sonda	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
Datos normalizados	97.0767168	32.21356304	1.70558488	0.086343829	0.186862151	19.53707819	1.531364753	6.975498538	0.103842051	26.25166552
Sonda	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
Datos normalizados	33.57748097	2.117601983	2.816319044	7.686220382	4.397992441	0.40089312	214.4184064	230.71127	0.131890189	2.232690034
Sonda	50	103	104	105						
Datos normalizados	0.038252614	7.013373509	27.69737264	0.60197028						

Tabla 8: Conjunto de datos comprobados para el fondo

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sonda										
Datos comprobados para BG	39.90146827	0	226.4348805	110.1761624	0	0	0	0	0	55.75664619
Sonda	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Datos comprobados para BG	46.20320406	0	0	0	164.7199777	0	0	0	0	38.19827022
Sonda	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Datos comprobados para BG	45.59413493	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sonda	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
Datos comprobados para BG	97.0767168	32.21356304	0	0	0	19.53707819	0	0	0	26.25166552
Sonda	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
Datos comprobados para BG	33.57748097	0	0	0	0	0	214.4184064	230.71127	0	0
Sonda	50	103	104	105						
Datos comprobados para BG	0	0	27.69737264	0						

Tabla 9: Conjunto de datos después del centrado

Sonda	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Datos centrados	-27.02354384	-12.62947631	-28.507661	-44.08041189	-40.59134184	-12.27079637	-21.78437749	46.35334588	-73.46749748	-51.51981803
Sonda	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Datos centrados	-301.3688994	-17.21722068	-8.046376162	-56.99541858	-39.70909832	-44.67724211	-0.926414605	-38.19314123	-154.2626382	-22.98898606
Sonda	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Datos centrados	-43.06202196	-119.7774288	-71.12408019	-40.62803664	-569.8209942	-1.989581656	-1.713457687	-87.14426606	-0.100282038	-67.94087802
Sonda	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
Datos centrados	-49.52345234	-83.87950772	-2.08008984	0	-1.989008551	-27.44811268	-39.2686822	-171.9883911	-37.67136638	-11.79766251
Sonda	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
Datos centrados	-142.341303	-24.07898983	-645.760442	-152.3347191	-328.003766	-40.94444343	-177.9405193	-327.5029234	-195.1030625	-2.3298666583
Sonda	50	103	104	105						
Datos centrados	-36.92478523	-40.85323644	-31.56030435	-8.717386493						

Tabla 10: Conjunto de datos proyectado por el vector de carga 15 (Etapa iii)

Vector de carga	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8
Datos proyectados por vector de carga	619.2184977	-402.8737744	-207.5503637	91.30908749	183.3507408	-77.14217491	543.9111741	-142.5242892
Vector de carga	PC9	PC10	PC11	PC12	PC13	PC14	PC15	
Datos proyectados por vector de carga	489.361778	172.0068772	-137.6666566	0.432754519	-113.8208536	-104.5873989	-40.45465493	

Tabla 11: Conjunto de datos reinflados (Etapa (iii))

Sonda	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Datos reinflados	-16.28527981	4.282976317	-21.0697846	-11.87483876	-30.26649115	5.141867717	-2.597888749	-41.2071567	-105.8671823	-110.2352987
Sonda	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Datos reinflados	-271.7114099	-47.26707379	-13.36384232	-3.708870897	-23.22096946	-35.53919007	-5.15748711	-4.006900436	-167.1165208	-22.55549691
Sonda	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Datos reinflados	-59.84469431	-147.4498659	-80.69592993	-42.95781022	-591.2771802	-16.57525981	-6.161210071	-60.45008896	-1.600920004	-79.04167189
Sonda	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
Datos reinflados	-68.74911311	-110.6602281	-4.4444441798	2.678325	1.082427477	0.27543201	-70.5725879	-177.80101	-60.90536079	-7.821457405
Sonda	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
Datos reinflados	-153.4686911	-20.35932606	-629.1116591	-133.4222904	-314.7722453	-42.34584901	-102.0087072	-321.0313364	-163.2957603	-3.59112869
Sonda	50	103	104	105						
Datos reinflados	-39.71174924	-35.69931905	-12.62559789	-23.73199124						

Tabla 12: Cuadrado de la diferencia entre los datos centrados (Tabla 9) y el conjunto de datos reinflados (Tabla 11) (Etapa (iv))

Sonda	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Diferencia	10.73826403	16.91245262	7.437876402	32.20557313	10.32485069	17.41266409	19.16648874	5.146189184	-32.39968487	-58.71548071
Cuadrado	115.3103144	286.0310537	55.32200537	1037.19894	106.6025418	303.2008705	367.3542906	26.48326312	1049.73958	3447.507675
Sonda	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Diferencia	29.65748947	-30.04985311	-5.31746616	53.28654769	16.48812886	9.138052039	-4.231072504	34.18624079	-12.85388267	0.433489153
Cuadrado	879.5666819	902.9936719	28.27544636	2839.458164	271.8583934	83.50399506	17.90197454	1168.699059	165.2222997	0.187912846
Sonda	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Diferencia	-16.78267235	-27.67243716	-9.57184974	-2.329773577	-21.45618596	-14.58567815	-4.447752384	26.69417709	-1.500637966	-11.10079396
Cuadrado	281.6580911	765.7637781	91.62030744	5.427844921	460.3679159	212.7420072	19.78250127	712.5790907	2.251914306	123.2276244
Sonda	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
Diferencia	-19.22566077	-26.78072039	-2.364351958	2.67833E-22	3.071436028	27.723544689	-31.30390571	-5.812618944	-23.23399441	3.976205105
Cuadrado	369.6260321	717.2069848	5.590160183	7.17343E-44	9.433719272	768.5949302	979.9345125	33.78653898	539.8184964	15.81020704
Sonda	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
Diferencia	-11.12738806	3.719663769	16.64878298	18.9124287	13.23152074	-1.401414709	75.93181214	6.471586973	31.80730217	-1.261262107
Cuadrado	123.818765	13.83589856	277.1819746	357.6799594	175.0731412	1.963963185	5765.640095	41.88143795	1011.704471	1.590782101
Sonda	50	103	104	105						
Diferencia	-2.786964008	5.153917393	18.93470646	-15.01460475						
Cuadrado	7.767168384	26.56286449	358.5231088	225.4383557						

## ES 2 881 280 T3

Suma de diferencias de cuadrados (Qres): 27656.3

Suma de valores después de los valores propios aplicados al conjunto de datos proyectados (Tabla 10): 77.30951 (T<sup>2</sup> de Hotelling; etapa (v))

5 A continuación, se compararon los valores de Qres y T<sup>2</sup> de Hotelling con valores umbrales predeterminados de normobióticos a disbióticos: [T<sup>2</sup> = 32.49 y Qres = 42834.81]. Se confirmó la probabilidad de disbiosis cuando el valor de T<sup>2</sup> supera el umbral.

10 Entonces se combinaron T<sup>2</sup> y Qres en una única métrica usando cuadrados; pesos (0.938 y 0.157) y raíz cuadrada (esto es, Fórmula III). La cifra resultante fue 2.318146

15 La métrica única resultante se trazó luego en una escala numérica con un punto de separación de clases de normobiótico a disbiótico de 0.395 (valor representativo 2), y umbrales adicionales en 1.632 (valor representativo 3), 2.492 (valor representativo 4) e infinito en un valor representativo de 5. Esto colocó la muestra entre los umbrales representados por los valores 3 y 4 (cerca del límite superior de 2.492 en el intervalo de 3 a 4). La ubicación precisa de la muestra de esta escala se calculó de la siguiente manera:

20 Se calculó el área de densidad de distribución normal logarítmica total entre 3 y 4:

0.6820813

0.4840499

25 0.1980315

(primero menos segundo es igual a tercero)

30 A continuación, se calculó el área de densidad de distribución logarítmica normal entre 3 y la muestra:

0.6502034

0.4840499

35 0.1661535

(primero menos segundo es igual a tercero)

40 El área de densidad de distribución logarítmica normal entre 3 y la muestra se dividió luego por el área de densidad de distribución logarítmica normal entre 3 y 4 para encontrar la fracción precisa: 0.8390257. Luego se agregó el número entero inferior (3) para obtener la posición precisa en la escala: 3.839026. Luego, esto se redondeó a 4 para la presentación de informes.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método implementado por ordenador para determinar la probabilidad de disbiosis del tracto GI en un sujeto, comprendiendo dicho método:
- 5 (i) proporcionar un conjunto de datos de prueba, en el que dicho conjunto de datos de prueba comprende al menos un perfil de la microbiota, siendo dicho perfil de la microbiota un perfil de los niveles relativos de una pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en una muestra del tracto GI del sujeto y en el que cada nivel de cada microorganismo o grupo de microorganismos es un elemento de perfil de dicho conjunto de datos de prueba,
- 10 (ii) aplicar a dicho conjunto de datos de prueba al menos un vector de carga, en el que dicho al menos un vector de carga es al menos una variable latente ortogonal determinada por el análisis de regresión de los niveles de dicha pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en las muestras del tracto GI correspondientes de una pluralidad de sujetos normales, produciendo así un primer conjunto de datos proyectados,
- 15 (iii) proporcionar dicho primer conjunto de datos proyectados,
- (iv) a partir de dicho primer conjunto de datos proyectados calcular el Q-residual del perfil de la microbiota y comparar el Q-residual del perfil de la microbiota con un valor de Q-residual de umbral normobiótico a disbiótico determinado a partir del análisis correspondiente de dicha pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en las muestras correspondientes del tracto GI de una pluralidad de sujetos normales y/o sujetos con disbiosis,
- 20 (v) a partir de dicho primer conjunto de datos proyectados, calcular el  $T^2$  de Hotelling para el perfil de la microbiota a partir de la varianza explicada por las variables latentes ortogonales determinadas por el análisis de regresión de los niveles de dicha pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en las muestras del tracto GI correspondientes de un pluralidad de sujetos normales de la etapa (ii) y comparar dicho  $T^2$  de Hotelling para el perfil de la microbiota con un valor de  $T^2$  de Hotelling umbral normobiótico a disbiótico determinado a partir del análisis correspondiente de dicha pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en las muestras del tracto GI correspondientes de una pluralidad de sujetos normales y/o una pluralidad de sujetos con disbiosis,
- 25 en el que la etapa (v) se puede realizar antes o después o simultáneamente con la etapa (iv), y en el que un perfil de la microbiota con un Q-residual o  $T^2$  de Hotelling por encima de dichos umbrales respectivos es indicativo de una probabilidad de disbiosis.
- 35 2. El método implementado por ordenador de la reivindicación 1, en el que dicho conjunto de datos de prueba comprende una pluralidad de perfiles de la microbiota y dicho conjunto de datos de prueba está dispuesto en una matriz.
- 40 3. El método implementado por ordenador de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dichas variables latentes ortogonales se determinan mediante la transformación ortogonal en componentes principales de los niveles de dicha pluralidad de microorganismos o grupos de microorganismos en las muestras del tracto GI correspondientes de una pluralidad de microorganismos sujetos normales, preferiblemente en los que la transformación ortogonal en componentes principales se realiza mediante al menos uno de los análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales, análisis de componentes principales, análisis de correlación canónica, análisis de redundancia, análisis de correspondencia y análisis de correspondencia canónica.
- 45 4. El método implementado por ordenador de cualquier reivindicación anterior, en el que se aplican al menos 2 vectores de carga, preferiblemente al menos 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 o 20 vectores de carga, y/o no más de 50 vectores de carga, preferiblemente no más de 40, 30, 25, 20, o 15 vectores de carga.
- 50 5. El método implementado por ordenador de cualquier reivindicación anterior, en el que el vector de carga se aplica en forma de matriz de proyección.
- 55 6. El método implementado por ordenador de cualquier reivindicación anterior, en el que dichos perfiles de la microbiota son cuantitativos o semicuantitativos y en el que dicho método proporciona una medida cuantitativa o semicuantitativa del grado de la disbiosis.
- 60 7. Un método implementado por ordenador para cuantificar la disbiosis, comprendiendo dicho método realizar el método de la reivindicación 6, en el que dichas comparaciones con umbrales normobióticos a disbióticos comprenden combinar el Q-residual de la etapa (iv) y el  $T^2$  de Hotelling de la etapa (v) en una única métrica para disbiosis, preferiblemente en la que se calcula la distancia euclidiana desde el origen tanto para el Q-residual de la etapa (iv) como para el  $T^2$  de Hotelling de la etapa (v) y preferiblemente en la que la distancia euclidiana desde el origen para ambos Q- residual y el  $T^2$  de Hotelling se calcula con la fórmula I:

$$r = \sqrt{\{T^2\}^2 + Q_{res}^2}$$

- 5 8. El método implementado por ordenador de la reivindicación 7, en el que la combinación del Q-residual de la etapa (iv) y el T<sup>2</sup> de Hotelling de la etapa (v) en una única métrica para disbiosis comprende escalar dicho Q-residual de la etapa (iv) y T<sup>2</sup> de Hotelling de la etapa (v) para dar como resultado valores de magnitud similar.
- 10 9. El método implementado por ordenador de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que dicha métrica única se traza en una escala numérica finita con una separación de clases de normobiosis a disbiosis en un punto predeterminado en dicha escala numérica finita que representa, o es, una combinación de los umbrales de clase normobiótica a disbiótica de las etapas (iv) y (v), escalados de manera similar si se ha aplicado el escalado.
- 15 10. El método implementado por ordenador de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que dicha métrica única se traza en una escala numérica finita con una separación de clases de normobiosis a disbiosis en un punto predeterminado en dicha escala numérica finita, y en el que
- 20 (a) para una muestra de prueba que tiene al menos uno de los Q-residuales de la etapa (iv) o T<sup>2</sup> de Hotelling de la etapa (v) por encima de los valores umbrales de clase normobiótica a disbiótica de las etapas (iv) y (v), respectivamente, dicho el punto de separación de clase corresponde al de uno u otro del valor umbral de clase normobiótico a disbiótico excedido de las etapas (iv) o (v), escalado de manera similar si se ha aplicado el escalado, y
- 25 (b) para una muestra de prueba en la que ni el Q-residual de la etapa (iv) ni el T<sup>2</sup> de Hotelling de la etapa (v) están más allá de los valores umbrales normobióticos a disbióticos de las etapas (iv) y (v), respectivamente, dicho el punto de separación de clases corresponde a la suma de los umbrales de clase normobiótica a disbiótica de las etapas (iv) y (v), con una escala similar si se ha aplicado el escalado.
- 30 11. El método implementado por ordenador de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que las ponderaciones se aplican al Q-residual de la etapa (iv) y al T<sup>2</sup> de Hotelling de la etapa (v) durante la segunda etapa de combinación, y en el que dichas ponderaciones minimizan la efectos de la variación técnica.
- 35 12. Un método implementado por ordenador para diagnosticar, controlar y/o caracterizar enfermedades y afecciones asociadas con perturbaciones en la microbiota del tracto GI o para evaluar el riesgo de desarrollar una enfermedad o afección asociada con una perturbación del perfil de la microbiota. del tracto GI, comprendiendo dicho método realizar un método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la indicación de la probabilidad de disbiosis o el grado de disbiosis es indicativa de la presencia o ausencia, el riesgo de desarrollar, el progreso de, o las características de dicha enfermedad o afección asociadas a perturbaciones en la microbiota del tracto GI.
- 40 13. El método implementado por ordenador de la reivindicación 12, en el que dicha enfermedad o afección asociada con una perturbación en la microbiota del tracto GI se selecciona entre trastornos funcionales del tracto GI, síndrome de sobrecrecimiento bacteriano del intestino delgado, cánceres del tracto GI, cáncer de mama, espondilitis anquilosante; esteatohepatitis no alcohólica; enfermedades atópicas, trastornos metabólicos, trastornos neurológicos, enfermedades autoinmunes, desnutrición, síndrome de fatiga crónica y autismo.
- 45 14. El método implementado por ordenador de cualquier reivindicación anterior, en el que dicho método comprende además una etapa anterior en la que se prepara al menos uno de dichos perfiles de la microbiota, preferiblemente en el que dicha etapa de preparación de dichos perfiles de la microbiota comprende análisis de ácidos nucleicos, preferiblemente secuenciación de ácidos nucleicos, hibridación de sonda de oligonucleótidos, amplificación de ácido nucleico basada en cebadores; detección basada en anticuerpos u otros ligandos de afinidad específicos; análisis proteómico o análisis metabólico, y preferiblemente en el que la muestra del tracto GI se selecciona de
- 50 (a) contenido luminal del tracto GI, preferiblemente contenido del estómago, contenido intestinal, moco y excrementos/heces, o combinaciones de los mismos,
- 55 (b) partes de la mucosa, la submucosa, la muscularis externa, la adventicia y/o la serosa de un tejido/órgano del tracto GI,
- (c) ácido nucleico preparado a partir de (a) o (b), preferiblemente mediante transcripción inversa y/o amplificación de ácido nucleico, o
- 60 (d) un cultivo microbiano de (a) o (b).
15. Un ordenador, sistema o aparato que lleva un programa adaptado para realizar el método de cualquier reivindicación anterior, en el que preferiblemente dicho sistema o aparato está además adaptado para realizar el perfilado de la microbiota o una etapa del mismo.

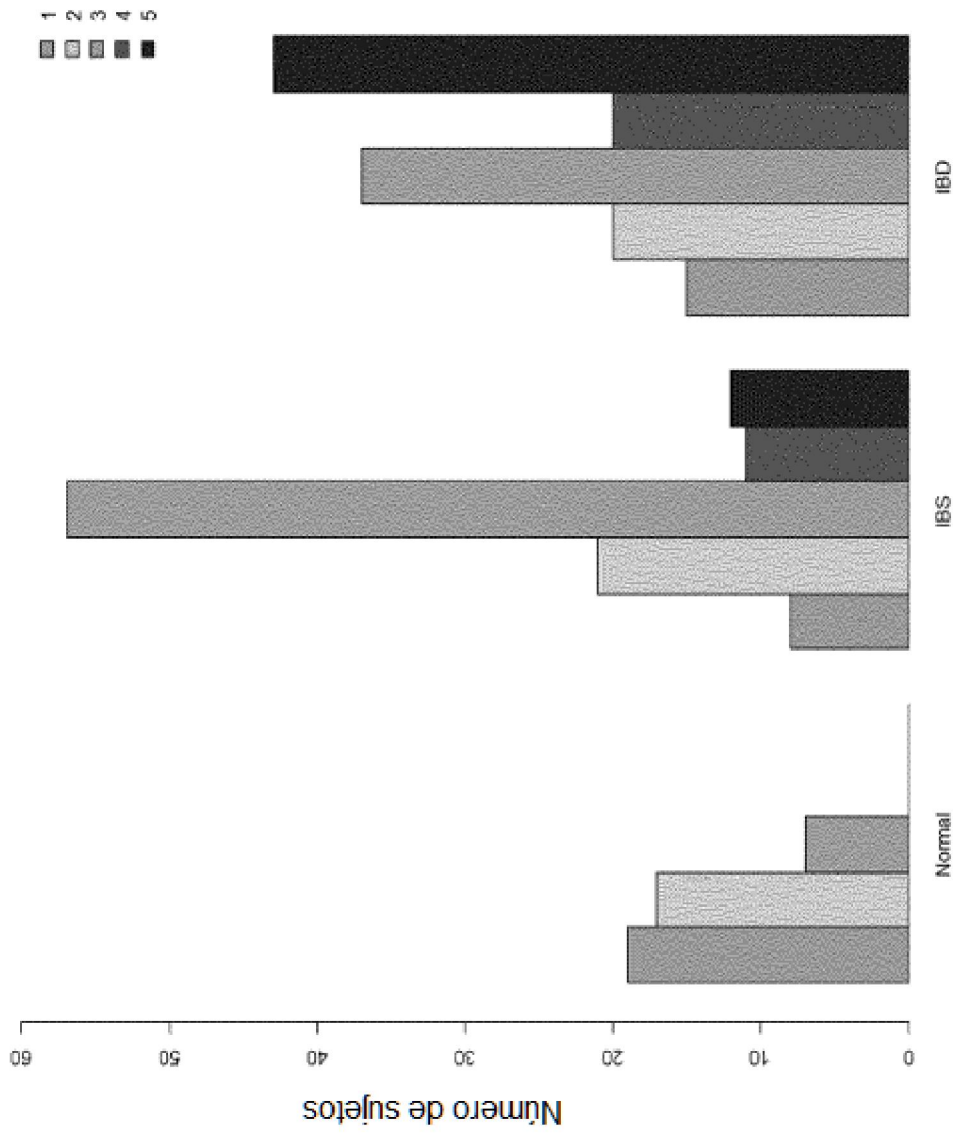


Figura 1

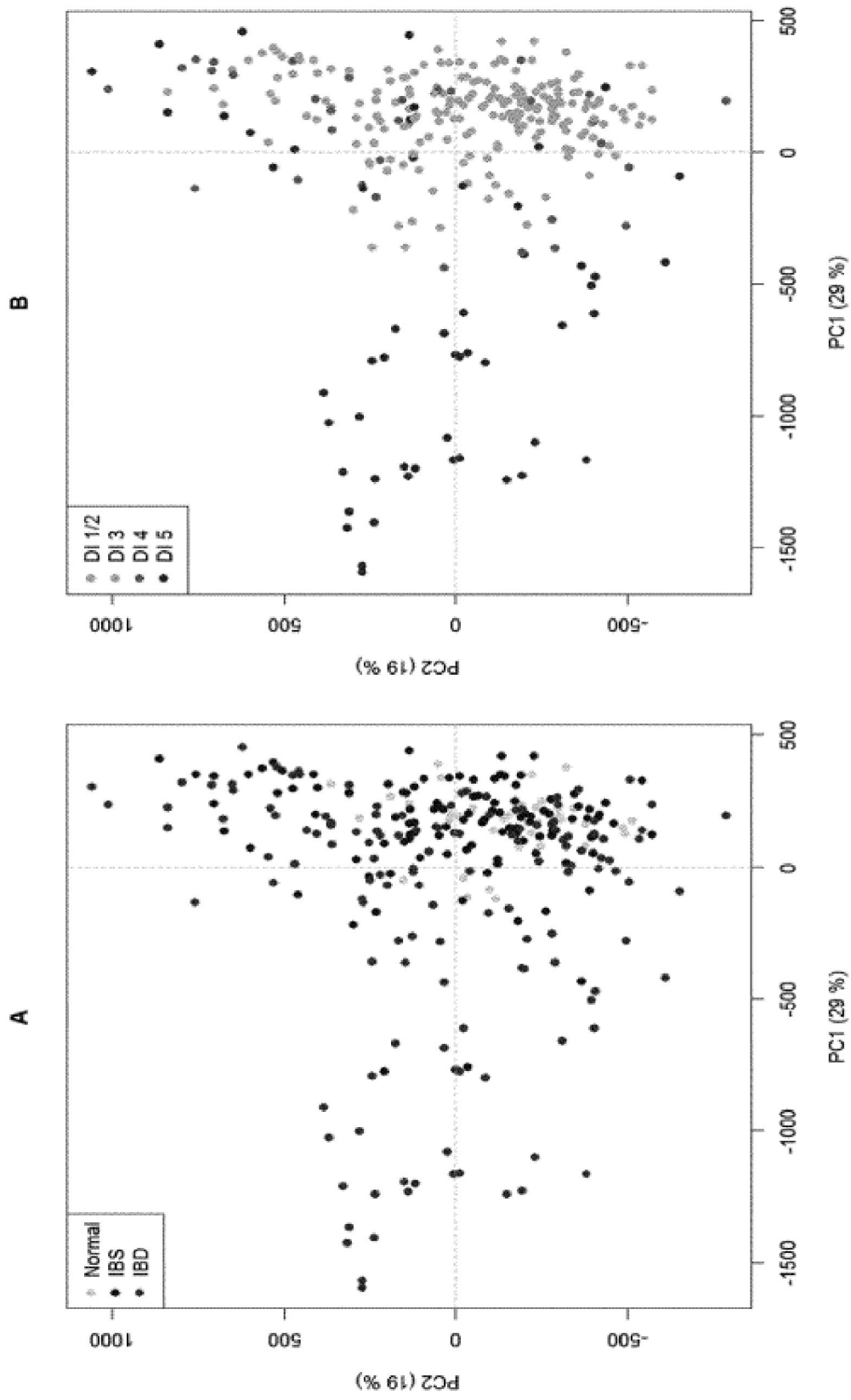


Figure 2

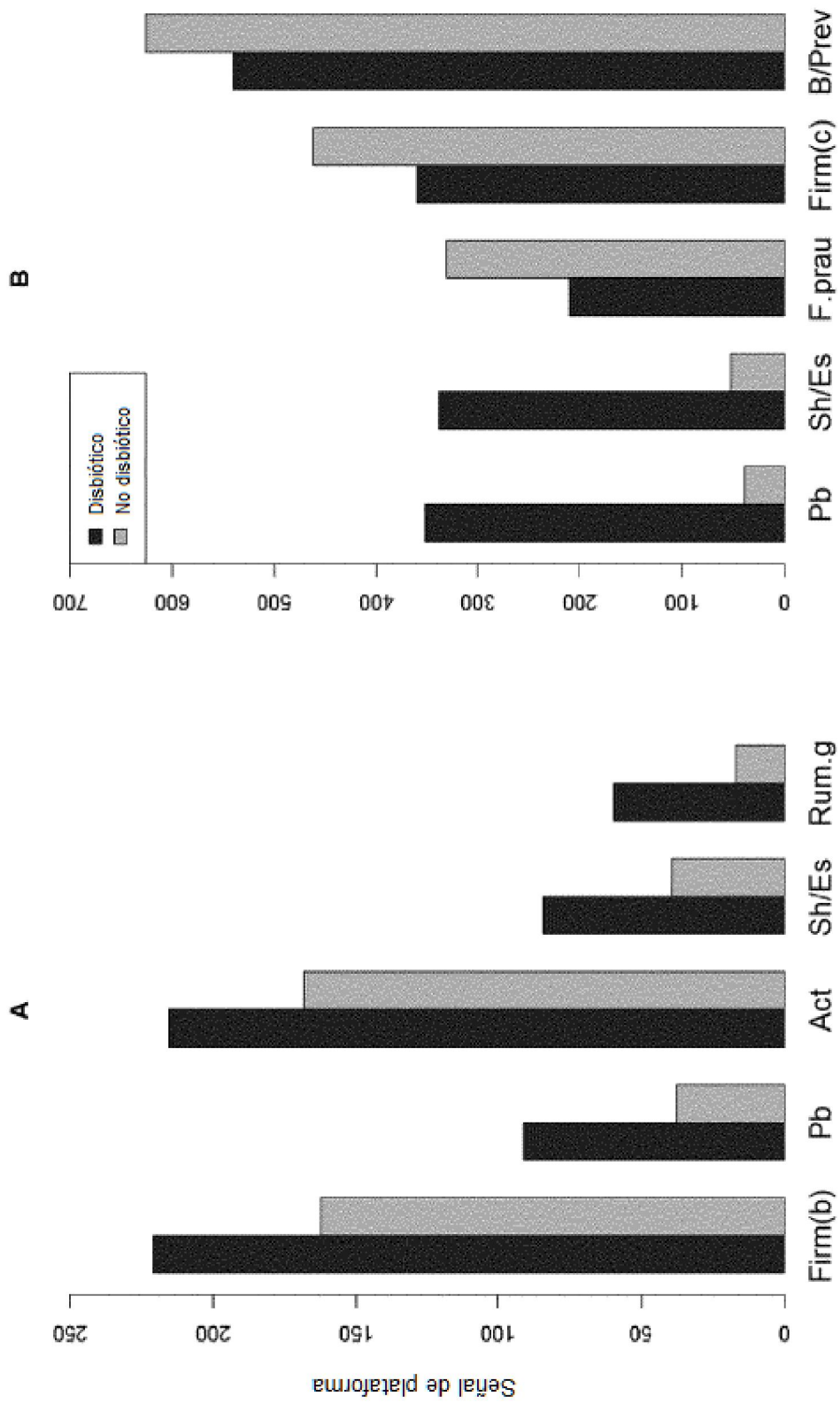


Figura 3

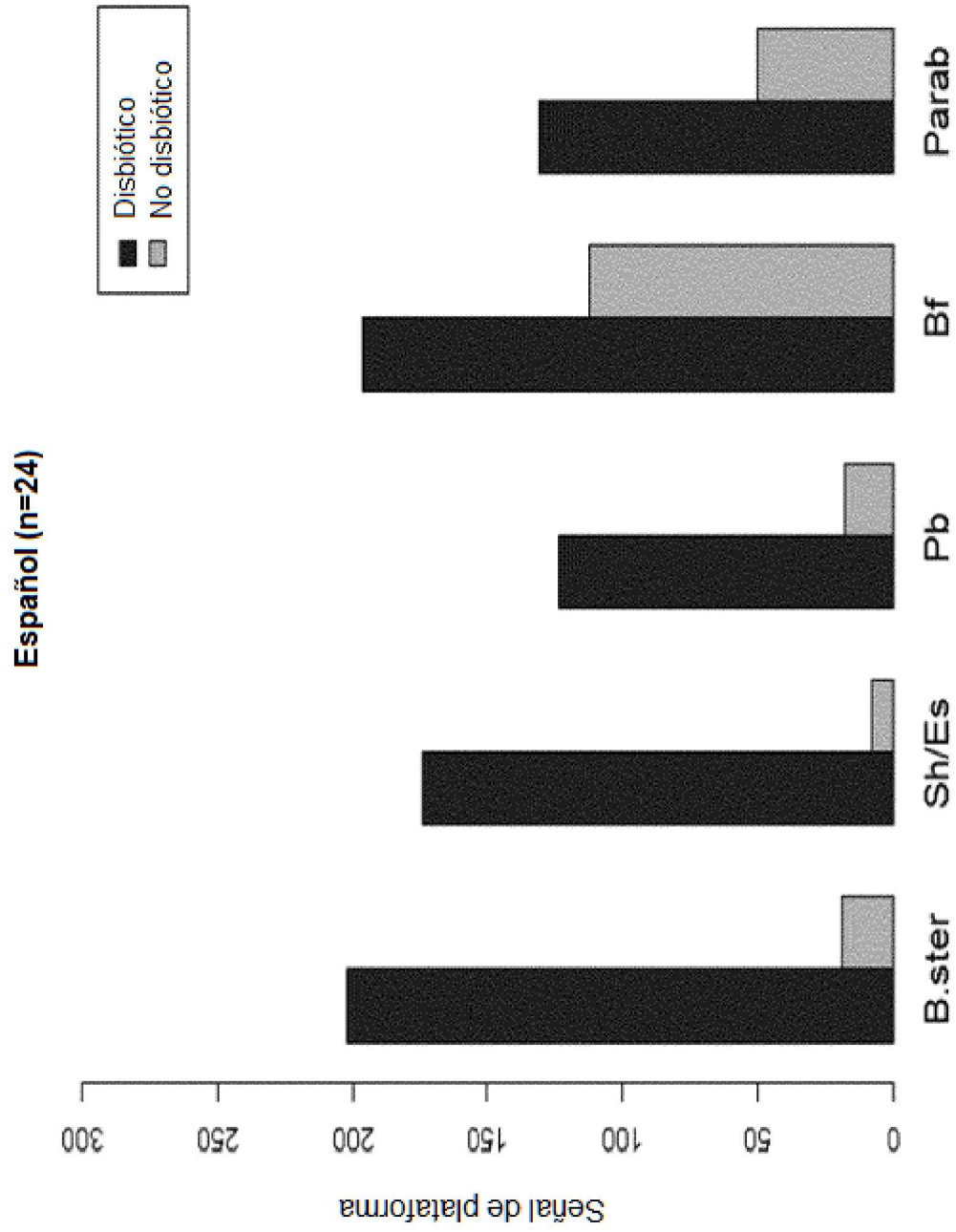


Figura 4

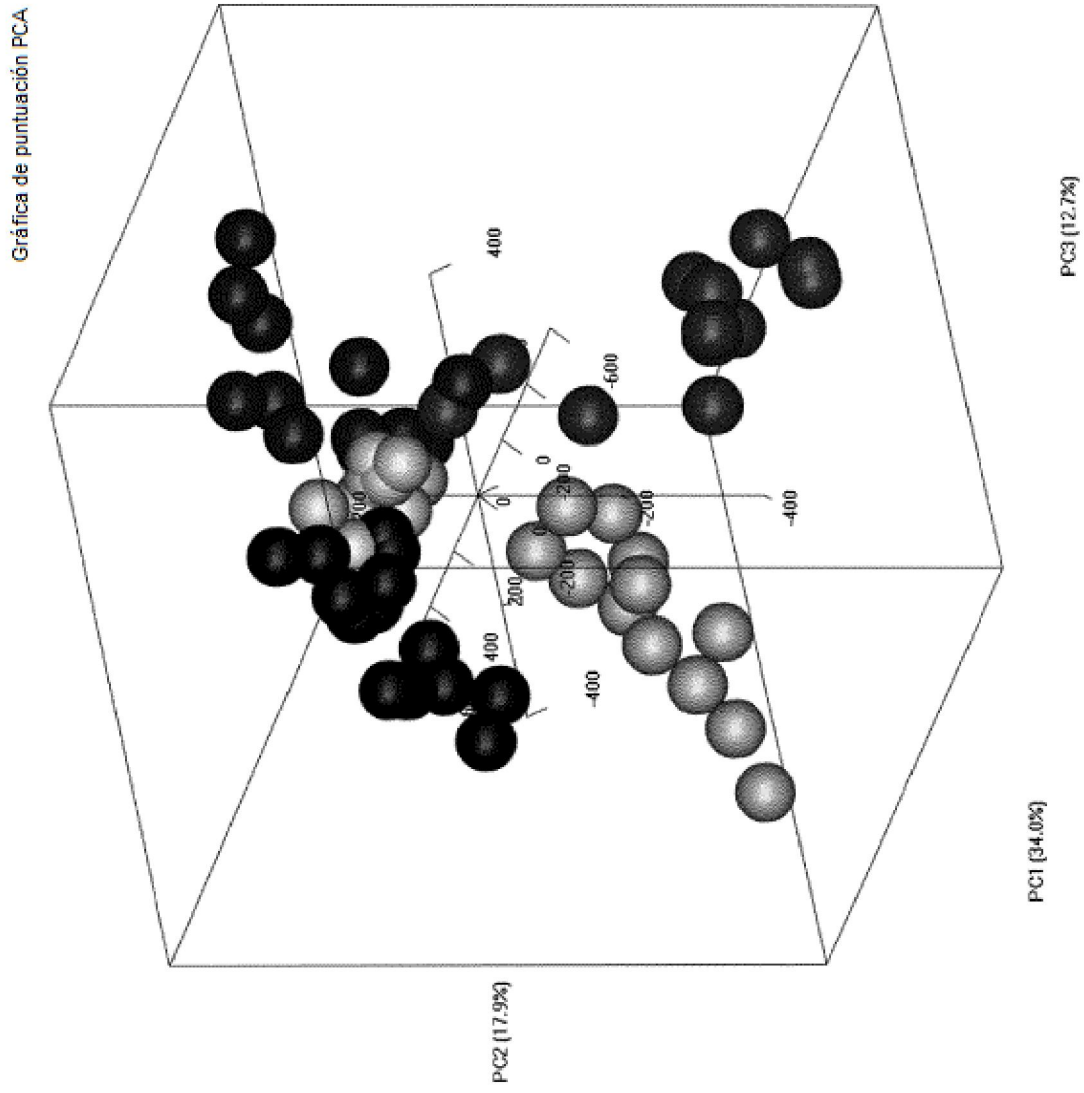


Figura 5