

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 826**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.10.2013** **PCT/EP2013/071765**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.04.2014** **WO14060538**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2013** **E 13779571 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018** **EP 2909336**

54 Título: **Determinación de la diversidad bacteriana intestinal reducida**

30 Prioridad:

17.10.2012 EP 12306282

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

28.09.2018

73 Titular/es:

**INSTITUTE NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (100.0%)
147, rue de l'Université
75007 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**LE CHATELIER (ÉPOUSE JANNIERE),
EMMANUELLE;
EHRlich, STANISLAV;
PEDERSEN, OLUF BORBYE y
HANSEN, TORBEN**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 683 826 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

Determinación de la diversidad bacteriana intestinal reducida.

- 5 La mayoría de enfermedades y síndromes humanos han sido atribuidos históricamente a una alteración del genoma humano. Sin embargo, mientras que las mutaciones de los genes humanos pueden correlacionarse con algunas patologías, sólo explican una pequeña proporción de los casos clínicos. Una explicación para ello es que una predisposición genética requiere estímulos epigenéticos para resultar en un fenotipo anormal. Las últimas investigaciones, sin embargo, apuntan a otra explicación: la flora bacteriana en el ser humano desempeña un
- 10 papel crucial en las predisposiciones a diferentes enfermedades (Clemente et al., Cell 148(6):1258-70, 2012).
- La flora bacteriana en el ser humano comprende miles de especies bacterianas, incluyendo bacterias comensales, beneficiosas o patógenas. El ser humano alberga la flora bacteriana en múltiples sitios, tales como la piel, los pulmones, la vagina, la boca y el intestino. Estas floras son diferentes en su localización y en su
- 15 composición de bacterias. La flora intestinal es la más abundante en composición. Se considera generalmente que comprende miles de especies bacterianas, presenta un peso aproximado de 1,5 kg y por sí misma constituye un rico repertorio génico, también denominado microbioma intestinal, que es 100 veces más grande que el genoma nuclear humano.
- 20 Es conocido que todas ellas desempeñan un papel en la maduración del sistema inmunológico y que presentan un impacto sobre la respuesta inmunológica. La flora de la piel se ha demostrado, por ejemplo, que desempeña un papel en el desarrollo de enfermedades inmunológicas, tales como el asma o la dermatitis atópica (Hanski et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109(21):8334-9, 2012).
- 25 Se ha demostrado que la flora intestinal desempeña un papel en el desarrollo de alergias, las enfermedades intestinales inflamatorias, el síndrome del intestino irritable y posiblemente trastornos metabólicos y degenerativos, tales como la obesidad, el síndrome metabólico, la diabetes y el cáncer. Mientras que la normobiosis, que califica el estado normal de la flora, aparentemente garantiza la homeostasis, la disbiosis, que es la distorsión respecto de la normobiosis, se correlaciona con una larga lista de enfermedades.
- 30 Se ha demostrado, por ejemplo, que una diversidad bacteriana reducida en la flora intestinal se asocia a enfermedades metabólicas tales como la obesidad (Ley et al., Nature 444(7122):1022-3, 2006), la diabetes de tipo I (Wen et al., Nature 455(7216):1109-1113, 2008; Giongo et al., ISME J. 5(1):82-91, 2011), el síndrome metabólico, la esteatosis hepática, la necroinflamación y la esteatohepatitis no alcohólica con fibrosis (Machado et al., Ann. Hepatol. 11(4):440-9, 2012). También se observa una flora intestinal alterada en patologías
- 35 relacionadas con la inflamación, tales como la colitis ulcerosa (Sasaki et al., J. Signal Transduct. 2012:704953, 2012) y las enfermedades intestinales inflamatorias pediátricas (Comito et al., Int. J. Inflam. 2012:687143, 2012). Además, la flora intestinal resulta por lo menos localmente afectada en el cáncer colorrectal (Sobhani et al., PLoS One 6(1):e16393, 2011).
- 40 A medida que una evidencia creciente apunta al papel de una diversidad bacteriana reducida de la flora intestinal en un amplio abanico de enfermedades, se vuelve crítica la capacidad técnica de evaluarla con precisión.
- Sin embargo, la evaluación de la diversidad bacteriana intestinal ha demostrado ser compleja. En efecto, sólo se
- 45 ha identificado y secuenciado una pequeña proporción de las especies de bacterias de la flora intestinal, principalmente debido a que la mayoría de bacterias intestinales no pueden cultivarse. Además, la mayoría de especies bacterianas sólo se encuentran presentes en un número de copia bajo en la flora intestinal, lo que las hace difíciles de detectar (Hamady y Knight, Genome Res. 19:1141-1152, 2009). Por lo tanto, la mayoría de bacterias intestinales todavía no han sido clasificadas taxonómicamente, lo que restringe la utilización como biomarcadores a las especies y géneros taxonómicamente conocidos.
- 50 De esta manera, la determinación de una diversidad bacteriana reducida hasta ahora se ha limitado generalmente a medir la abundancia relativa de las especies o filos bacterianos conocidos, en lugar de determinar la abundancia de todas las especies de la flora intestinal. Por ejemplo, con respecto a la diabetes de tipo I, es conocido que la proporción de bacterias *Bacteroidetes* se incrementa con el tiempo en sujetos no sanos (es decir, positivos para autoanticuerpos, "autoinmunes"), mientras que la proporción de las bacterias *Firmicutes* se incrementa en sujetos sanos sin tendencia a diabetes de tipo I (Wen et al., Nature 455(7216):1109-1113, 2008). Sin embargo, la evolución de la proporción de especies no clasificadas taxonómicamente en relación a dicha enfermedad, así como muchas otras, sigue resultando difícil de evaluar.
- 60 Por lo tanto, los procedimientos actuales sólo pueden informar de diferencias en la proporción de bacterias conocidas. Por este motivo no son suficientemente sensibles y con toda probabilidad subestiman la población real de personas que presentan una diversidad bacteriana intestinal reducida.
- 65 Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de un procedimiento integral para determinar con precisión una diversidad bacteriana intestinal reducida en un sujeto que se base en marcadores específicos. Este

procedimiento de esta manera no se encontraría limitado a técnicas o equipos específicos y, por lo tanto, podría implementarse ampliamente.

Leyenda de las figuras

Figura 1: distribución de individuos de recuento génico bajo y alto en la población total de 292 individuos. Parte superior: recuentos génicos de todas las lecturas de emparejamiento único. Parte media: recuentos génicos ajustados a 11 millones de lecturas de emparejamiento único por individuo. Parte inferior: distribuciones de recuentos génicos en diferentes enterotipos. Recuadro: enterotipos de individuos de bajo y alto recuento génico (BRG y ARG); B, P y R representan enterotipos controlados por *Bacteroides*, *Prevotella* y *Ruminococcus/Methanobrevibacter*, respectivamente.

Figura 2: las especies bacterianas presentan diferentes distribuciones entre los 292 individuos de alto y bajo recuento génico. Parte superior: presencia y abundancia de 50 genes 'trazadores' de las nueve especies conocidas más abundante y de 7 especies bacterianas desconocidas. Las filas corresponden a los genes y la abundancia relativa de cada gen se indica mediante el color, incrementándose de gris pálido a gris oscuro; el blanco indica que no se ha detectado ningún gen. Las columnas corresponden a los individuos, que están ordenados en número creciente de genes. Los valores en el lado derecho de la figura proporcionan la probabilidad de Wilcoxon (q) de que una especie presente una abundancia diferente en individuos de bajo y alto recuento génico; la abundancia de una especie en un individuo se calculó como la media de abundancias de los genes trazadores. Parte inferior izquierda: valores de AUC obtenidos para las mejores combinaciones de 1 a 19 especies en el análisis de ROC. Parte inferior derecha: AUC para la mejor combinación de 4 especies (se utilizaron las 4 especies taxonómicamente desconocidas con las probabilidades q más bajas mostradas en la parte superior).

Figura 3: presencia y abundancia de 50 genes 'trazadores' para las especies significativamente diferentes en individuos de BRG y ARG. Las filas corresponden a genes y la abundancia relativa de cada gen se indica mediante el color, incrementándose de gris pálido a gris oscuro; el blanco indica genes no detectados. Las columnas corresponden a los 292 individuos de la cohorte, que están ordenados por número creciente de genes. En la parte derecha se ilustra la fracción de individuos que presenta una proporción dada de genes trazados para cada especie; la fracción se representa en el eje y como porcentaje entre 0 y 1 y el número de genes se representa en el eje x. Conjuntamente el 70% de los individuos presenta ningún gen o todos los genes de una especie; 87 presentan <10% o >90%.

Descripción

La presente invención se refiere a un procedimiento para determinar si un sujeto presenta una diversidad bacteriana intestinal reducida. Dicha determinación resulta útil en particular para evaluar si dicho sujeto presenta riesgo de desarrollar una patología, tal como, p.ej., la diabetes de tipo II, el síndrome hiperglucémico, enfermedades cardíacas, la resistencia a la insulina y la estasis hepática. Los inventores han demostrado que resulta posible discriminar entre individuos que presentan una diversidad bacteriana intestinal reducida y los que presentan una diversidad bacteriana intestinal normal simplemente evaluando la presencia de un número pequeño de dichas especies bacterianas en el intestino.

Los inventores han encontrado un conjunto de especies bacterianas específicas, la presencia o ausencia del cual en el ADN bacteriano de las heces de un sujeto se correlaciona significativamente con una diversidad bacteriana intestinal reducida.

La expresión "diversidad bacteriana intestinal reducida" en la presente memoria se refiere a una flora intestinal en la que el número de especies bacterianas se encuentra reducido respecto a la flora intestinal normal promedio.

Por ejemplo, la comparación entre una flora de ensayo y una flora intestinal normal puede llevarse a cabo mediante el genotipado de secuencias obtenidas de las muestras biológicas, por ejemplo mediante secuenciación de ADN masiva en paralelo. En este caso, un sujeto con diversidad bacteriana reducida puede presentar un microbioma que comprende menos de 480.000 recuentos de genes bacterianos, en el que dichos recuentos se obtuvieron mediante secuenciación del ADN microbiano intestinal obtenido a partir de una muestra de 200 mg de heces mediante secuenciación de alto rendimiento basada en Illumina, la localización de las secuencias obtenidas en el mapa del genoma bacteriano de referencia (tal como se indica en Arumugam et al., Nature 473(7346):174-80, 2011), la eliminación de la contaminación humana, el descarte de las lecturas localizadas en múltiples posiciones y basado en la cantidad total de lecturas emparejadas remanentes.

Según la invención, un sujeto presenta una diversidad bacteriana intestinal reducida o una diversidad bacteriana normal. El experto en la materia entenderá entonces fácilmente que, en el caso de que el procedimiento de la invención no determina que el sujeto con sobrepeso presenta una diversidad bacteriana intestinal reducida, dicho sujeto evidentemente presenta una diversidad bacteriana intestinal normal. la expresión "diversidad bacteriana

intestinal normal" en la presente memoria se refiere a una flora intestinal en la que el número de especies bacterianas es aproximadamente el número observado en la flora intestinal normal promedio, es decir, entre 10% inferior y 10% superior al número de especies bacterianas observadas en la flora intestinal normal promedio.

El término "flora" en la presente memoria se refiere a la microflora y microfauna en un ecosistema, tal como los intestinos, la boca, la vagina o los pulmones. En microbiología, flora (en plural, floras) se refiere colectivamente a las bacterias y otros microorganismos en un ecosistema (p.ej. alguna parte del cuerpo de un huésped animal). La "flora intestinal" consiste en todas las especies bacterianas que constituyen la flora presente en el intestino de un individuo.

Una especie bacteriana según la invención comprende no sólo las especies bacterianas conocidas sino también especies que todavía no han sido descritas taxonómicamente. En efecto, hayan sido descritas taxonómicamente o no, las especies bacterianas pueden caracterizadas por su genoma. Por ejemplo, los procedimientos para caracterizar las bacterias utilizando la información genética se han descrito en Vandamme et al. (Microbiol. Rev. 60(2):407, 1996).

Resultará evidente para el experto en la materia que los genes de una especie bacteriana se encuentran unidos físicamente como una unidad y no distribuidos independientemente entre individuos, es decir, el genoma de dicha especie bacteriana comprende secuencias génicas que siempre se encuentran presentes o ausentes juntos entre individuos. Por lo tanto, las especies bacterianas pueden definirse a partir de partes de su genoma y la secuenciación del genoma completo de la especie bacteriana no resulta necesaria para la identificación correcta de la especie bacteriana.

Por ejemplo, un procedimiento para la identificación de especies bacterianas en una composición microbiana basado en la secuenciación del ADN bacteriana y la utilización de genes marcadores como referencias taxonómicas ha sido descrito en Liu et al. (BMC Genomics 12(S2):S4, 2011). El experto en la materia puede referirse además a Arumugam et al. (Nature 473(7346):174-80, 2011) o Qin et al. (Nature 490(7418):55-60, 2012) para procedimientos detallados de identificación de especies bacterianas basados en la secuenciación del ADN bacteriano.

Según la presente invención, una "especie bacteriana" es un grupo de genes bacterianos del microbioma intestinal, el nivel de abundancia del cual varía en la misma proporción en diferentes muestras individuales. En otras palabras, una especie bacteriana según la invención es una agrupación de secuencias de genes bacterianos los niveles de abundancia de las cuales en muestras de diferentes sujetos se encuentran estadísticamente asociados y no distribuidos aleatoriamente. Resultará inmediatamente evidente al experto en la materia que dicha agrupación corresponde de esta manera a una especie bacteriana.

Los genes del microbioma pueden atribuirse a una especie bacteriana mediante varios procedimientos estadísticos conocidos por el experto en la materia. Preferentemente se utiliza un procedimiento estadístico utilizado para someter a ensayo la covarianza para someter a ensayo si dos genes pertenecen a la misma agrupación. Con este fin, el experto en la materia puede utilizar medidas no paramétricas de dependencia estadística, tales como el coeficiente de correlación de rangos de Spearman, por ejemplo. Más preferentemente, una especie bacteriana según la invención es una agrupación que comprende genes bacterianos intestinales y que se determina mediante el procedimiento utilizado en Qin et al. (Nature 490(7418):55-60, 2012) para identificar grupos de ligamiento metagenómicos.

El término "sujeto" en la presente memoria se refiere a un vertebrado, preferentemente un mamífero, y todavía más preferentemente a un ser humano. Existen varias maneras de obtener muestras de ADN microbiano intestinal de dicho sujeto (Sokol et al., Inflamm. Bowel Dis. 14(6):858-867, 2008). Por ejemplo, resulta posible preparar especímenes mucosales, o biopsias, obtenidas mediante colonoscopia. Sin embargo, la colonoscopia es un procedimiento invasivo que no está bien definido en términos del procedimiento de recolección de estudio a estudio. De manera similar, resulta posible obtener biopsias mediante cirugía. Sin embargo, aún más que la colonoscopia, la cirugía es un procedimiento invasivo, el cual presenta efectos desconocidos sobre la población microbiana. Resulta preferente el análisis fecal, un procedimiento que ha sido utilizado fiablemente en la técnica (Bullock et al., Curr. Issues Intest. Microbiol. 5(2):59-64, 2004; Manichanh et al., Gut 55:205-211, 2006; Bakir et al., Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56(5):931-935, 2006; Manichanh et al., Nucl. Acids Res. 36(16):5180-5188, 2008; Sokol et al., Inflamm. Bowel Dis. 14(6):858-867, 2008). Un ejemplo de dicho procedimiento se describe en la sección de procedimientos de los Ejemplos experimentales. Las heces contienen aproximadamente 10¹¹ células bacterianas en cada gramo (peso húmedo) y las células bacterianas comprenden aproximadamente 50% de la masa fecal. La flora de las heces representa principalmente la microbiología del intestino grueso distal. De esta manera, resulta posible aislar y analizar grandes cantidades de ADN microbiano a partir de las heces de un individuo. La expresión "ADN microbiano intestinal" en la presente memoria se refiere al ADN de cualquiera de las comunidades bacterianas residentes en el intestino humano. La expresión "ADN microbiano intestinal" comprende secuencias tanto codificantes como no codificantes; en particular no se encuentra restringido a genes enteros sino que también comprende fragmentos de secuencias codificantes. De esta manera, el análisis fecal es un procedimiento no invasivo que rinde resultados consistentes y directamente comparables de paciente a

paciente.

Tal como se ha explicado anteriormente, el "microbioma intestinal", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere al juego de genes bacterianos de las especies que constituyen la flora presente en el intestino de dicho sujeto. Las secuencias del microbioma de la invención comprenden por lo menos secuencias génicas del catálogo de genes bacterianos publicado por Qin et al. (Nature 464:59-65, 2010). Las secuencias génicas del catálogo se encuentran disponibles de los sitios de internet del EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/EMBL/seqdata/blast/>) y del BGI (<http://gutmeta.genomics.org.cn>).

Las especies bacterianas listadas en la Tabla 1 se encuentran ausentes del microbioma intestinal de una proporción significativa de sujetos con una diversidad bacteriana reducida, mientras que las especies bacterianas listadas en la Tabla 2 se encuentran presentes en el microbioma intestinal de una proporción significativa de sujetos con una diversidad bacteriana reducida.

Dichas especies no se encuentran limitadas a las que ya se conocen de la técnica anterior. Resulta importante que dichas especies bacterianas específicas muestran un elevado coeficiente de correlación con una diversidad bacteriana intestinal reducida. De esta manera, resulta posible determinar si un sujeto presenta una diversidad bacteriana intestinal reducida con una elevada sensibilidad. La sensibilidad de un procedimiento es la proporción de positivos reales que se identifican correctamente como tales y puede estimarse a partir del área bajo la curva ROC (por sus siglas en inglés, características de operador-receptor), también denominada AUC. Una característica de operador-receptor (ROC) o simplemente curva ROC es una función gráfica que ilustra el rendimiento de un sistema clasificador binario a medida que varía su umbral de discriminación. Se crea representando gráficamente la fracción de positivos reales de entre los positivos (TVP=tasa de verdaderos positivos) vs. la fracción de falsos positivos de entre los negativos (TFP=tasa de falsos positivos) en diversas configuraciones de umbral. La TVP también se conoce como sensibilidad y la TFP es uno menos la especificidad o tasa de verdaderos negativos. El área bajo la curva (AUC) es una medida del rendimiento de un clasificador/ensayo a través de todos los valores posibles de los umbrales. A mayor AUC, mejor rendimiento del ensayo.

En el contexto de la presente invención se ha descubierto que no resulta necesario determinar la presencia o la ausencia de cada especie individual para evaluar la diversidad de la población bacteriana intestinal. Por el contrario, dicha diversidad puede evaluarse con un elevado grado de confianza y precisión mediante el examen de un subconjunto muy pequeño de especies bacterianas. Tal como se muestra en la parte experimental, un número muy pequeño de especies es un buen marcador de dicha diversidad. En efecto, incluso en el caso de que se evalúe la presencia o ausencia de únicamente una especie bacteriana, el procedimiento de la invención permite la detección de una diversidad bacteriana reducida en un sujeto con una AUC de por lo menos 0,69 y puede ser de hasta 0,936 según la especie bacteriana seleccionada para el ensayo.

En comparación, un procedimiento aleatorio habitualmente presenta una AUC de 0,5. Además, en la evaluación de la enfermedad intestinal inflamatoria, una de las patologías asociadas a una diversidad bacteriana reducida, mediante secuenciación del ARNr 16S de muestras fecales, la AUC es de sólo 0,83 (Papa et al., PLoS One 7(6):e39242, 2012).

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para determinar si un sujeto presenta una diversidad bacteriana intestinal reducida según el presente juego de reivindicaciones.

En una primera forma de realización, el procedimiento de la invención se basa en la determinación de la presencia o ausencia de por lo menos una especie bacteriana. De esta manera, según dicha forma de realización, la invención se refiere a un procedimiento para determinar si un sujeto presenta una diversidad bacteriana intestinal reducida, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de detectar la presencia o la ausencia de por lo menos una especie bacteriana, preferentemente de entre las 58 especies bacterianas de las Tablas 1 y 2, en el intestino de dicho sujeto. La expresión "por lo menos una especie bacteriana" en la presente memoria se refiere a que se evalúa la presencia o ausencia de una única especie o de más de una especie. En una forma de realización preferente, el procedimiento de la invención incluye la detección de la presencia o ausencia de 1, 2, 2, 4 o 5 especies. Todavía más preferentemente, dicho procedimiento incluye la detección de la presencia o ausencia de más de 5 especies. Lo más preferentemente, dicho procedimiento incluye la detección de la presencia o ausencia de 58 especies.

Las especies bacterianas de la invención se seleccionan de entre la lista que consiste en las especies bacterianas de las tablas 1 y 2. Más exactamente, las especies bacterianas de la invención se seleccionan de entre la lista que consiste en HL-1, HL-2, HL-3, HL-4, HL-5, HL-6, HL-7, HL-8, HL-9, HL-10, HL-11, HL-12, HL-13, HL-14, HL-15, HL-16, HL-17, HL-18, HL-19, HL-20, HL-21, HL-22, HL-23, HL-24, HL-25, HL-26, HL-27, HL-28, HL-29, HL-30, HL-31, HL-32, HL-33, HL-34, HL-35, HL-36, HL-37, HL-38, HL-39, HL-40, HL-41, HL-42, HL-43, HL-44, HL-45, HL-46, HL-47, HL-48, HL-49, HL-50, HL-51, HL-52, HL-53, HL-54, HL-55, HL-56, HL-57 y HL-58.

La mayoría de comensales intestinales no puede cultivarse. Se han desarrollado estrategias genómicas para

superar dicha limitación (Hamady y Knight, *Genome Res.* 19:1141-1152, 2009). Estas estrategias han permitido la definición del microbioma como la colección de los genes comprendidos en los genes de la flora (Turnbaugh et al., *Nature* 449:804-8010, 2007; Hamady y Knight, *Genome Res.* 19:1141-1152, 2009). Se ha demostrado la existencia de un número pequeño de especies que comparten todos los individuos que constituye el núcleo filogenético de la flora intestinal humana (Tap et al., *Environ. Microbiol.* 11(10):2574-2584, 2009). recientemente, un análisis metagenómico ha conducido a la identificación de un extenso catálogo de 3,3 millones de genes microbianos no redundantes del intestino humano, correspondientes a 576,7 gigabases de secuencia (Qin et al., *Nature* 464(7285):59-65, 2010).

Resultará inmediatamente evidente para el experto en la materia que la presencia de una especie bacteriana puede determinarse fácilmente mediante la detección de una secuencia de ácidos nucleicos específica de dicha especie. La presencia de especies bacterianas intestinales se determina habitualmente mediante la detección de secuencias génicas de ARNr 16S. Sin embargo, dicho procedimiento se encuentra limitado a las especies bacterianas conocidas.

En contraste, en el procedimiento de la invención, no se requiere una identificación previa de las especies bacterianas a las que pertenece dicho gen. Los inventores han determinado un juego mínimo de 50 secuencias génicas bacterianas que son secuencias no redundantes de cada especie bacteriana de las tablas 1 y 2 y que pueden utilizarse como genes trazadores.

Tabla 1: especies bacterianas ausentes en sujetos con una diversidad bacteriana intestinal reducida

Especie bacteriana	Secuencia génica bacteriana
HL-1	SEC ID nº 1 a 50
HL-2	SEC ID nº 51 a 100
HL-3	SEC ID nº 101 a 150
HL-4	SEC ID nº 151 a 200
HL-5	SEC ID nº 201 a 250
HL-6	SEC ID nº 251 a 300
HL-8	SEC ID nº 351 a 400
HL-9	SEC ID nº 401 a 450
HL-10	SEC ID nº 451 a 500
HL-11	SEC ID nº 501 a 550
HL-12	SEC ID nº 551 a 600
HL-13	SEC ID nº 601 a 650
HL-14	SEC ID nº 651 a 700
HL-16	SEC ID nº 751 a 800
HL-17	SEC ID nº 801 a 850
HL-18	SEC ID nº 851 a 900
HL-19	SEC ID nº 901 a 950
HL-21	SEC ID nº 1001 a 1050
HL-22	SEC ID nº 1051 a 1100
HL-23	SEC ID nº 1101 a 1150
HL-24	SEC ID nº 1151 a 1200
HL-25	SEC ID nº 1201 a 1250
HL-26	SEC ID nº 1251 a 1300
HL-27	SEC ID nº 1301 a 1350
HL-28	SEC ID nº 1351 a 1400
HL-29	SEC ID nº 1401 a 1450
HL-30	SEC ID nº 1451 a 1500
HL-31	SEC ID nº 1501 a 1550
HL-32	SEC ID nº 1551 a 1600
HL-33	SEC ID nº 1601 a 1650
HL-34	SEC ID nº 1651 a 1700
HL-35	SEC ID nº 1701 a 1750
HL-36	SEC ID nº 1751 a 1800
HL-37	SEC ID nº 1801 a 1850
HL-40	SEC ID nº 1951 a 2000
HL-41	SEC ID nº 2001 a 2050
HL-42	SEC ID nº 2051 a 2100
HL-43	SEC ID nº 2101 a 2150
HL-44	SEC ID nº 2151 a 2200
HL-45	SEC ID nº 2201 a 2250
HL-46	SEC ID nº 2251 a 2300

Especie bacteriana	Secuencia génica bacteriana
HL-47	SEC ID nº 2301 a 2350
HL-48	SEC ID nº 2351 a 2400
HL-50	SEC ID nº 2451 a 2500
HL-51	SEC ID nº 2501 a 2550
HL-52	SEC ID nº 2551 a 2600
HL-53	SEC ID nº 2601 a 2650
HL-54	SEC ID nº 2651 a 2700
HL-55	SEC ID nº 2701 a 2750
HL-57	SEC ID nº 2801 a 2850
HL-58	SEC ID nº 2851 a 2900

Tabla 2: especies bacterianas presentes en sujetos con una diversidad bacteriana intestinal reducida

Especies bacterianas	Secuencia génica bacteriana
HL-7	SEC ID nº 301 a 350
HL-15	SEC ID nº 701 a 750
HL-20	SEC ID nº 951 a 1000
HL-38	SEC ID nº 1851 a 1900
HL-39	SEC ID nº 1901 a 1950
HL-49	SEC ID nº 2401 a 2450
HL-56	SEC ID nº 2751 a 2800

Resultará evidente para el experto en la materia que el número de bacterias de una especie bacteriana dada en una muestra se correlaciona directamente con el número de copias de por lo menos una secuencia génica detectada en dicha muestra. De esta manera, resulta posible determinar la presencia de por lo menos una de las especies bacterianas de la Tabla 1, o la ausencia de por lo menos una de las especies bacterianas de la Tabla 2, simplemente mediante la detección de la ausencia de por lo menos un gen bacteriano de dicha especie.

Por lo tanto, la invención permite evaluar una diversidad bacteriana intestinal reducida en un sujeto sin necesidad de análisis estadísticos complejos y tediosos. Además, debido a que el procedimiento de la descripción puede basarse en tan solo un gen bacteriano como marcador, puede implementarse mediante cualquier técnica conocida de amplificación o secuenciación del ADN y no se encuentra limitada a un procedimiento o aparato específico.

Según una forma de realización preferente de la descripción, el procedimiento para determinar si un sujeto presenta una diversidad bacteriana intestinal reducida comprende una etapa de detección a partir de una muestra de ADN microbiano intestinal obtenida de dicho sujeto, de si por lo menos un gen de por lo menos una especie bacteriana de la Tabla 1 se encuentra ausente en dicha muestra. Alternativamente, dicho procedimiento comprende una etapa de detección a partir de una muestra de ADN microbiano intestinal obtenida de dicho sujeto, de si por lo menos un gen de por lo menos una especie bacteriana de la Tabla 2 se encuentra presente en dicha muestra. Preferentemente, el procedimiento de la descripción comprende una etapa de detección a partir de una muestra de ADN microbiano intestinal obtenida de dicho sujeto, de si por lo menos un gen de por lo menos una especie bacteriana de la Tabla 1 se encuentra ausente en dicha muestra y si por lo menos un gen de por lo menos una especie bacteriana de la Tabla 2 se encuentra presente en dicha muestra.

Otra forma de realización preferente de la descripción es un procedimiento para determinar si un sujeto presenta una diversidad bacteriana intestinal reducida, comprendiendo dicho procedimiento:

- detectar a partir de una muestra de ADN microbiano intestinal obtenida de dicho sujeto si por lo menos un gen de por lo menos una especie bacteriana de la Tabla 1 se encuentra ausente en dicha muestra y
- determinar que el sujeto presenta una diversidad bacteriana intestinal reducida, en el caso de que por lo menos un gen de por lo menos una especie bacteriana de la Tabla 1 se encuentre ausente en dicha muestra.

Todavía otra forma de realización preferente de la descripción es un procedimiento para determinar si un sujeto presenta una diversidad bacteriana intestinal reducida, comprendiendo dicho procedimiento:

- detectar a partir de una muestra de ADN microbiano intestinal obtenida de dicho sujeto, si por lo menos un gen de por lo menos una especie bacteriana de la Tabla 2 se encuentra presente en dicha muestra, y
- determinar que el sujeto presenta una diversidad bacteriana intestinal reducida, en el caso de que por lo menos un gen de por lo menos una especie bacteriana de la Tabla 2 se encuentra presente en dicha muestra.

En una forma de realización preferente, las secuencias génicas bacterianas de la agrupación bacteriana según la descripción se seleccionan de entre la lista que consiste en la secuencia SEC ID nº 1 a la secuencia SEC ID nº 2.900.

Dependiendo del tamaño de la muestra y de la incidencia de los genes bacterianos de interés, determinados genes bacterianos pueden resultar difíciles de detectar en una muestra. El experto en la materia podría de esta manera concebir fácilmente que, para incrementar la fiabilidad de los resultados, resulta ventajoso determinar la ausencia de una especie bacteriana mediante la detección de la abundancia media de varios genes bacterianos de una especie bacteriana.

En una forma de realización, detectar si por lo menos un gen bacteriano de por lo menos una especie bacteriana de la Tabla 1 se encuentra ausente en dicha muestra comprende determinar el número de copias de por lo menos 1, 2, 3, 4 o 5 genes bacterianos de dicha especie bacteriana en la muestra. En una forma de realización preferente, detectar si por lo menos un gen bacteriano de por lo menos una especie bacteriana de la Tabla 1 se encuentra ausente en dicha muestra comprende determinar el número de copias de por lo menos 10, 20, 30, 40 o por lo menos 50 genes bacterianos de dicha especie bacteriana en la muestra.

Además, entre todos los genes bacterianos, algunas especies bacterianas se correlacionan más significativamente con una diversidad bacteriana intestinal reducida que otras. La detección de la presencia o ausencia de la especie bacteriana más correlacionada puede permitir ventajosamente la determinación de una diversidad bacteriana intestinal reducida con una sensibilidad mucho mejor que los procedimientos de la técnica anterior. Por ejemplo, tal como se muestra en la parte experimental, la detección de la presencia o ausencia de una de las especies bacterianas HL-1, HL-57, HL-53, HL-4, HL-54, HL-2, HL-3, HL-8, HL-10, HL-45, HL-22, HL-26, HL-9, HL-5, HL-11, HL-14, HL-13, HL-18, HL-12 o HL-21 permite la detección de una diversidad bacteriana reducida en un sujeto con una AUC superior a 0,83. De esta manera resulta posible incrementar la sensibilidad del procedimiento de la invención simplemente mediante la evaluación de la presencia o ausencia de dichas especies bacterianas específicas.

En una forma de realización ventajosa, el procedimiento de la descripción comprende una etapa de detección a partir de una muestra de ADN microbiano intestinal obtenida de dicho sujeto de si por lo menos un gen de una especie bacteriana seleccionada de entre la lista que consiste en HL-1, HL-57, HL-53, HL-4, HL-54, HL-2, HL-3, HL-8, HL-10, HL-45, HL-22, HL-26, HL-9, HL-5, HL-11, HL-14, HL-13, HL-18, HL-12 HL-21 de la Tabla 1 se encuentra ausente en dicha muestra.

En una forma de realización particularmente ventajosa, el procedimiento de la descripción comprende una etapa de detección a partir de una muestra de ADN microbiano intestinal obtenida de dicho sujeto de si por lo menos un gen de la especie bacteriana HL-1 de la Tabla 1 se encuentra ausente en dicha muestra.

El experto en la materia conoce que cuantas más especies bacterianas distintas de la Tabla 1 se encuentren presentes en el ADN bacteriano procedente de las heces del sujeto y cuantas más especies bacterianas distintas de la Tabla 2 se encuentren ausentes del ADN bacteriano procedente de las heces del sujeto, mayor será la probabilidad de que lo sujetos presenten una diversidad bacteriana intestinal reducida. A partir de lo anterior resultará evidente para el experto en la materia que la sensibilidad del procedimiento de la descripción puede incrementarse mediante la evaluación de la presencia o ausencia de genes bacterianos de varias especies bacterianas diferentes de la Tabla 1 y/o de la Tabla 2. De esta manera resulta posible incrementar la sensibilidad del procedimiento mediante la utilización de genes bacterianos de una combinación lineal de 2, 3, 4, 5 o más especies bacterianas diferentes. Por ejemplo, las combinaciones de 2 especies bacterianas de la Tabla 1 y/o 2 permite una AUC de entre aproximadamente 0,736 y 0,955; las combinaciones de 3 especies bacterianas de la Tabla 1 y/o 2 permite una AUC de entre aproximadamente 0,734 y 0,966, y las combinaciones de 4 especies bacterianas de la Tabla 1 y/o 2 permite una AUC de entre aproximadamente 0,734 y 0,975. Sin embargo, los inventores han encontrado inesperadamente que la detección de combinaciones específicas de 2, 3 o 4 especies bacterianas permite una AUC muy elevada. Las combinaciones más ventajosas de 2, 3 y 4 especies bacterianas se indican en las Tablas 7, 8 y 9, respectivamente.

En una forma de realización preferente, el procedimiento de la descripción comprende una etapa de detección a partir de una muestra de ADN microbiano intestinal obtenida de dicho sujeto de si por lo menos un gen de cada especie bacteriana de cualquiera de las combinaciones de especies bacterianas indicadas en las tablas 7, 8 y/o 9 se encuentra ausente y/o presente en dicha muestra.

El experto en la materia observará que las combinaciones de especies bacterianas indicadas en las Tablas 7, 8 y/o 9 son combinaciones de especies bacterianas indicadas en las Tablas 1 y 2. Por lo tanto, el experto en la materia evidentemente entenderá que la detección de si por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas de una combinación de especies bacterianas indicada en las Tablas 7, 8 y/o 9 se encuentra ausente y/o presente en dicha muestra corresponde a la detección de si:

- por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas de dicha combinación, en la que dichas especies bacterianas también se indican en la Tabla 1, se encuentra ausente y

- por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas de dicha combinación, en la que dichas especies bacterianas también se indica en la Tabla 2, se encuentra presente,

en dicha muestra.

Los inventores han seleccionado adicionalmente combinaciones de especies bacterianas de 2 a 20 especies bacterianas que permiten una AUC particularmente importante, indicada en la Tabla 10, comprendida entre 0,955 y 0,982. Por lo tanto, resulta posible conseguir una gran sensibilidad simplemente evaluando la presencia o ausencia de por lo menos un gen bacteriano de cada especie bacteria a partir de una combinación específica.

En una forma de realización ventajosa, el procedimiento de la descripción comprende una etapa de detección a partir de una muestra de ADN microbiano intestinal obtenida de dicho sujeto, de si:

- por lo menos un gen de cada especie bacteriana HL-1 y HL-5 de la Tabla 1 se encuentra ausente en dicha muestra, o
- por lo menos un gen de cada especie bacteriana HL-10, HL-1 y HL-5 de la Tabla 1 se encuentra ausente en dicha muestra, o
- por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas HL-8, HL-3, HL-53 y HL-26 de la Tabla 1 se encuentran ausentes en dicha muestra, o
- por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas HL-10, HL-26, HL-8, HL-53 y HL-3 de la Tabla 1 se encuentran ausentes en dicha muestra, o
- por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas HL-53, HL-8, HL-13, HL-3, HL-26 y HL-37 de la Tabla 1 se encuentran ausentes en dicha muestra, o
- por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas HL-37, HL-26, HL-10, HL-8, HL-21, HL-53 y HL-11 de la Tabla 1 se encuentran ausentes en dicha muestra, o
- por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas HL-10, HL-5, HL-26, HL-25, HL-53, HL-22, HL-8 y HL-17 de la Tabla 1 se encuentran ausentes en dicha muestra, o
- por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas HL-26, HL-37, HL-21, HL-10, HL-5, HL-17, HL-16, HL-8 y HL-3 de la Tabla 1 se encuentran ausentes en dicha muestra, o
- por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas HL-11, HL-27, HL-35, HL-8, HL-22, HL-47, HL-26, HL-10 y HL-37 de la Tabla 1 se encuentran ausentes y por lo menos un gen de la especie bacteriana HL-15 de la Tabla 2 se encuentra presente en dicha muestra,
- por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas HL-28, HL-21, HL-5, HL-27, HL-26, HL-17, HL-3, HL-40, HL-37 y HL-25 de la Tabla 1 se encuentra ausente y por lo menos un gen de las especies bacterianas HL-38 de la Tabla 2 se encuentra presente en dicha muestra,
- por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas HL-8, HL-45, HL-35, HL-53, HL-17, HL-26, HL-3, HL-18, HL-10, HL-37 y HL-40 de la Tabla 1 se encuentra ausente y por lo menos un gen de la especie bacteriana HL-15 de la Tabla 2 se encuentra presente en dicha muestra,
- por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas HL-33, HL-13, HL-10, HL-28, HL-36, HL-17, HL-8, HL-3, HL-22, HL-53, HL-35, HL-5 y HL-27 de la Tabla 1 se encuentra ausente de dicha muestra, o
- por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas HL-56, HL-17, HL-21, HL-35, HL-40, HL-26, HL-12, HL-13, HL-45, HL-3, HL-5, HL-10, HL-8 y HL-27 de la Tabla 1 se encuentra ausente de dicha muestra, o
- por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas HL-31, HL-11, HL-25, HL-10, HL-35, HL-12, HL-28, HL-37, HL-5, HL-33, HL-17, HL-51, HL-27 y HL-40 de la Tabla 1 se encuentra ausente y por lo menos un gen de la especie bacteriana HL-15 de la Tabla 2 se encuentra presente en dicha muestra,
- por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas HL-33, HL-51, HL-39, HL-27, HL-56, HL-31, HL-23, HL-10, HL-18, HL-4, HL-11, HL-8, HL-21, HL-45, HL-5 y HL-17 de la Tabla 1 se encuentra ausente

de dicha muestra, o

- por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas HL-45, HL-27, HL-47, HL-5, HL-51, HL-8, HL-26, HL-3, HL-53, HL-37, HL-13, HL-11, HL-17, HL-23, HL-1 y HL-28 de la Tabla 1 se encuentra ausente y por lo menos un gen de la especie bacteriana HL-38 de la Tabla 2 se encuentra presente en dicha muestra,
- por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas HL-31, HL-11, HL-33, HL-28, HL-36, HL-21, HL-22, HL-4, HL-37, HL-45, HL-27, HL-15, HL-51, HL-8 y HL-17 de la Tabla 1 se encuentra ausente y por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas HL-49, HL-38 y HL-56 de la Tabla 2 se encuentra presente en dicha muestra,
- por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas, HL-18, HL-56, HL-28, HL-36, HL-45, HL-17, HL-35, HL-33, HL-11, HL-5, HL-8, HL-10, HL-12, HL-25 y HL-22 de la Tabla 1 se encuentra ausente y por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas HL-39, HL-49, HL-7 y HL-15 de la Tabla 2 se encuentra presente en dicha muestra,
- por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas HL-47, HL-5, HL-36, HL-37, HL-35, HL-44, HL-11, HL-8, HL-17, HL-31, HL-18, HL-13, HL-21, HL-51, HL-4, HL-28, HL-45, HL-33 y HL-3 de la Tabla 1 se encuentra ausente y por lo menos un gen de las especies bacterianas HL-15 de la Tabla 2 se encuentra presente en dicha muestra.

Un gen bacteriano se encuentra ausente de la muestra en el caso de que su número de copias en la muestra sea inferior a un valor umbral determinado. De acuerdo con lo anterior, se encuentra presente un gen bacteriano en la muestra en el caso de que su número de copias en la muestra sea inferior a un valor umbral determinado.

Según la presente invención, un "valor umbral" pretende referirse a un valor que permite discriminar muestras en las que el número de copias del gen bacteriano de interés es bajo o alto.

En particular, en el caso de que el número de copias de un gen bacteriano de interés sea inferior o igual al valor umbral, el número de copias de dicho gen bacteriano en la muestra se considera bajo, mientras que en el caso de que el número de copias sea superior al valor umbral, el número de copias de dicho gen bacteriano en la muestra se considera alto. Un número de copia bajo se refiere a que el gen bacteriano se encuentra ausente de la muestra, mientras que un número de copia elevado significa que el gen bacteriano se encuentra presente en la muestra.

Para cada gen, y dependiendo del procedimiento utilizado para medir el número de copias del gen bacteriano, el valor umbral óptimo puede variar. Sin embargo, el experto en la materia puede determinarlo fácilmente basándose en el análisis del microbioma de varios individuos en los que es conocido el número de copias (bajo o alto) para dicho gen bacteriano particular, y en la comparación del mismo con el número de copias de un gen de control. Dicha comparación puede facilitarse mediante la utilización de la misma cantidad de ADN bacteriano para cada una de las muestras analizadas o mediante la división del número de copias del gen bacteriano obtenido por la cantidad inicial de ADN bacteriano utilizada en el ensayo. En efecto, es bien conocido para el experto en la materia que la cantidad total de bacterias en el intestino de un sujeto, y en consecuencia en sus heces, permanece igual incluso en el caso de una diversidad bacteriana reducida. También resulta posible utilizar una referencia, tal como una especie bacteriana intestinal cuya abundancia es conocida que no varía entre individuos con diversidad bacteriana reducida y normal.

Según la descripción, puede conseguirse la determinación del número de copias de por lo menos un gen bacteriano en una muestra obtenida del sujeto, mediante cualquier técnica capaz de detectar y cuantificar las secuencias de ácidos nucleicos e incluye, entre otras, la hibridación con una sonda marcada, la amplificación por PCR, la secuenciación y todos los demás procedimientos conocidos por el experto en la materia.

En una primera forma de realización, la determinación del número de copias de por lo menos un gen bacteriano en una muestra obtenida del sujeto se lleva a cabo utilizando la secuenciación. Opcionalmente, el ADN debe fragmentarse, por ejemplo con una nucleasa de restricción antes de la secuenciación. La secuenciación se lleva a cabo utilizando cualquier técnica conocida del estado de la técnica, incluyendo la secuenciación mediante ligación, la pirosecuenciación, la secuenciación mediante síntesis o la secuenciación de moléculas individuales. La secuenciación incluye además las técnicas basadas en la PCR, tales como, por ejemplo, la PCR cuantitativa o la PCR en emulsión.

La secuenciación se lleva a cabo en el ADN total contenido en la muestra biológica, o en partes del ADN contenido en la muestra biológica. Resultará inmediatamente evidente para el experto que dicha muestra contiene por lo menos una mezcla de ADN bacteriano y ADN humano del sujeto huésped. Sin embargo, aunque el ADN bacteriano global es probable que represente la fracción principal del ADN total presente en la muestra, cada especie bacteriana puede representar únicamente una fracción pequeña del ADN total presente en la

muestra.

Para superar dicha dificultad, el experto puede utilizar un procedimiento que permite el genotipado cuantitativo de secuencias obtenidas de la muestra biológica con una alta precisión. En una forma de realización de dicho enfoque, la precisión se consigue mediante el análisis de un gran número (por ejemplo, millones o miles de millones) de polinucleótidos. Además, la precisión puede incrementarse mediante la utilización de la secuenciación de ADN masiva en paralelo, tal como, aunque sin limitación, la realizada por la plataforma analizadora del genoma de Illumina (Bentley et al., *Nature* 456:53-59, 2008), la plataforma 454 de Roche (Margulies et al., *Nature* 437:376-380, 2005), la plataforma ABI SOLiD (McKernan et al., *Genome Res.* 19:1527-1541, 2009), la plataforma de secuenciación de moléculas individuales Helicos (Harris et al., *Science* 320:106-109, 2008), la secuenciación en tiempo real utilizando moléculas únicas de polimerasa (*Science* 323:133-138, 2009), la secuenciación Ion Torrent (documento nº WO 2010/008480; Rothberg et al., *Nature* 475:348-352, 2011) y la secuenciación de nanoporos (Clarke J. et al., *Nat. Nanotechnol.* 4:265-270, 2009).

En el caso de que el experto se base en el procedimiento de secuenciación para detectar la presencia o ausencia de determinados genes bacterianos, la información recogida de la secuenciación se utiliza para determinar el número de copias de las secuencias de ácidos nucleicos de interés mediante procedimientos bioinformáticos. Por ejemplo, en una forma de realización, las secuencias de ácidos nucleicos de dicha especie bacteriana en la muestra de ADN bacteriano intestinal se identifican en los datos de secuenciación globales mediante comparación con las secuencias de ácidos nucleicos SEC ID nº 1 a SEC ID nº 2.900. Esta comparación se basa ventajosamente en el nivel de identidad de secuencia con las secuencias SEC ID nº 1 a SEC ID nº 2.900.

De esta manera, una secuencia de ácidos nucleicos que muestra una identidad de por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99% o por lo menos 100% respecto a por lo menos una de las secuencias de ácidos nucleicos SEC ID nº 1 a SEC ID nº 2.900 se identifica como una secuencia comprendida en una de las especies bacterianas de la descripción.

De esta manera, en una forma de realización preferente, la detección de si por lo menos una especie bacteriana de la Tabla 1 se encuentra ausente y/o por lo menos una especie de la Tabla 2 se encuentra presente en dicha muestra, comprende determinar el número de secuencias de ácidos nucleicos en la muestra de ADN bacteriano intestinal que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90%, de por lo menos 95%, de por lo menos 96%, de por lo menos 97%, de por lo menos 98%, de por lo menos 99% o de por lo menos 100% respecto a por lo menos una de las secuencias de ácidos nucleicos SEC ID nº 1 a SEC ID nº 2.900.

La expresión "identidad de secuencia" en la presente memoria se refiere a la identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos. La identidad entre secuencias puede determinarse mediante la comparación de una posición en cada una de las secuencias que puede alinearse para los fines de comparación. En el caso de que una posición en las secuencias comparadas se encuentre ocupada por la misma base, entonces las secuencias son idénticas en dicha posición. Un grado de identidad de secuencia entre las secuencias de ácidos nucleicos es una función del número de nucleótidos idénticos en posiciones compartidas en dichas secuencias.

Con el fin de determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos, las secuencias se alinean para una comparación óptima. Por ejemplo, pueden introducirse huecos en la secuencia de una primera secuencia de ácidos nucleicos para la alineación óptima con la segunda secuencia de ácidos nucleicos. A continuación, se comparan los nucleótidos en las posiciones nucleótidas correspondientes. En el caso de que una posición en la primera secuencia se encuentre ocupada por el mismo nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias. Por lo tanto, % de identidad=número de posiciones idénticas/número total de posiciones solapantes X 100.

En dicha comparación, las secuencias pueden presentar la misma longitud o pueden ser de longitud diferente. La alineación óptima de secuencias para determinar una ventana de comparación puede llevarse a cabo mediante el algoritmo de homologías locales de Smith y Waterman (*J. Theor. Biol.* 91(2):370-380, 1981), mediante el algoritmo de alineación de homologías de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48(3):443-453, 1972), mediante la búsqueda de similitudes por el procedimiento de Pearson y Lipman (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85(5):2444-2448, 1988), mediante implementaciones informatizadas de dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el software Wisconsin Genetics Software Package versión 7.0, Genetics Computer Group, 575, Science Drive, Madison, Wisconsin) o mediante inspección. Se selecciona la mejor alineación (es decir, que resulta en el porcentaje de identidad más alto a lo largo de la ventana de comparación) generada por los diversos procedimientos.

La expresión "identidad de secuencia" significa de esta manera que las dos secuencias polinucleótidas son idénticas (es decir, nucleótido a nucleótido) a lo largo de la ventana de comparación. La expresión "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula mediante la comparación de dos secuencias óptimamente alineadas a lo largo

de la ventana de comparación, la determinación del número de posiciones en las que se observa una base de ácido nucleico idéntica (p.ej. A, T, C, G, U o I) en ambas secuencias, rindiendo el número de posiciones correspondientes, dividiendo el número de posiciones correspondientes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. Puede aplicarse el mismo procedimiento a las secuencias polipeptídicas. El porcentaje de identidad de secuencia de una secuencia de ácidos nucleicos o de una secuencia de aminoácidos también puede calcularse utilizando el software BLAST (versión 2.06 de septiembre de 1998) con el parámetro por defecto o definido por el usuario.

En otra forma de realización preferente, se utilizan técnicas basadas en la PCR para determinar el número de copias de por lo menos un gen bacteriano. Preferentemente, las técnicas de PCR utilizada mide cuantitativamente las cantidades iniciales de ADN, ADNc o ARN. Entre los ejemplos de técnicas basadas en la PCR según la descripción se incluyen técnicas tales como, aunque sin limitación, la PCR cuantitativa (Q-PCR), la reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR), la PCR de transcriptasa inversa cuantitativa (QRT-PCR), la amplificación por círculo rodante (RCA; por sus siglas en inglés) o la PCR digital. Estas técnicas son tecnologías bien conocidas y fácilmente disponibles para el experto en la materia y no requieren una descripción precisa. En una forma de realización preferente, la determinación del número de copias de los genes bacterianos de la descripción se lleva a cabo mediante PCR cuantitativa.

Los cebadores de amplificación específicos para los genes que deben someterse a ensayo de esta manera resultan muy útiles para llevar a cabo los procedimientos según la descripción. De esta manera, la presente descripción comprende además cebadores para amplificar por lo menos un gen seleccionado de entre los genes de secuencia SEC ID nº 1 a nº 2.900.

En otra forma de realización preferente, la presencia o ausencia de los genes bacterianos según la invención se detecta mediante la utilización de una micromatriz nucleica.

Según la invención, una "micromatriz nucleica" consiste en diferentes sondas de ácidos nucleicos que se encuentran unidas a un sustrato, que puede ser un microchip, un portaobjetos de vidrio o una perla de tamaño de microesfera. Un microchip puede estar constituido de polímeros, plásticos, resinas, polisacáridos, sílice o materiales basados en el sílice, carbono, metales, vidrios inorgánicos o nitrocelulosa. Las sondas pueden ser ácidos nucleicos, tales como ADNc ("micromatriz de ADNc") u oligonucleótidos ("micromatriz de oligonucleótidos") y los oligonucleótidos pueden presentar una longitud de entre aproximadamente 25 y aproximadamente 60 pares de bases o menos.

Con el fin de determinar el número de copia de una muestra de ácidos nucleicos diana, dicha muestra se marca, se pone en contacto con la micromatriz bajo condiciones de hibridación, conduciendo a la formación de complejos entre los ácidos nucleicos diana que son complementarios a las secuencias de la sonda unidas a la superficie de la micromatriz. A continuación, se detecta la presencia de complejos hibridados marcados. Muchas variantes de la tecnología de hibridación de micromatrices se encuentra disponible para el experto en la materia.

En una forma de realización específica, la micromatriz nucleica es una micromatriz de oligonucleótidos que comprende por lo menos un oligonucleótido específico para por lo menos un gen que presenta una secuencia seleccionada de entre las SEC ID nº 1 a nº 2.900. Preferentemente, dicha micromatriz comprende por lo menos 58 oligonucleótidos, siendo cada oligonucleótido específico para un gen de una agrupación diferente de la descripción. Más preferentemente, la micromatriz de la descripción consiste en 2.900 oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes de secuencias SEC ID nº 1 a nº 2.900.

En otra forma de realización, la micromatriz nucleica es una micromatriz de oligonucleótidos que comprende por lo menos un oligonucleótido específico para por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas HL-10, HL-1 y HL-5. Preferentemente, la micromatriz nucleica es una micromatriz de oligonucleótidos que comprende o que consiste en oligonucleótidos específicos para por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30 o 40 genes de cada una de las especies bacterianas HL-10, HL-1 y HL-5.

En otra forma de realización, la micromatriz nucleica es una micromatriz de oligonucleótidos que comprende por lo menos un oligonucleótido específico para por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas HL-8, HL-3, HL-53 y HL-26. Preferentemente, la micromatriz nucleica es una micromatriz de oligonucleótidos que comprende o que consiste en oligonucleótidos específicos para por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30 o 40 genes de cada una de las especies bacterianas HL-8, HL-3, HL-53 y HL-26.

En otra forma de realización, la micromatriz nucleica es una micromatriz de oligonucleótidos que comprende por lo menos un oligonucleótido específico para por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas HL-10, HL-26, HL-8, HL-53 y HL-3. Preferentemente, la micromatriz nucleica es una micromatriz de oligonucleótidos que comprende o que consiste en oligonucleótidos específicos para por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30 o 40 genes de cada una de las especies bacterianas HL-10, HL-26, HL-8, HL-53 y HL-3.

bacterianas HL-31, HL-11, HL-25, HL-10, HL-35, HL-12, HL-28, HL-37, HL-5, HL-33, HL-17, HL-51, HL-27, HL-40 y HL-15.

En otra forma de realización, la micromatriz nucleica es una micromatriz de oligonucleótidos que comprende por lo menos un oligonucleótido específico para por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas HL-33, HL-51, HL-39, HL-27, HL-56, HL-31, HL-23, HL-10, HL-18, HL-4, HL-11, HL-8, HL-21, HL-45, HL-5 y HL-17. Preferentemente, la micromatriz nucleica es una micromatriz de oligonucleótidos que comprende o que consiste en oligonucleótidos específicos para por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30 o 40 genes de cada una de las especies bacterianas HL-33, HL-51, HL-39, HL-27, HL-56, HL-31, HL-23, HL-10, HL-18, HL-4, HL-11, HL-8, HL-21, HL-45, HL-5 y HL-17.

En otra forma de realización, la micromatriz nucleica es una micromatriz de oligonucleótidos que comprende por lo menos un oligonucleótido específico para por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas HL-45, HL-27, HL-47, HL-5, HL-51, HL-8, HL-26, HL-3, HL-53, HL-37, HL-13, HL-11, HL-17, HL-23, HL-1 y HL-28. Preferentemente, la micromatriz nucleica es una micromatriz de oligonucleótidos que comprende o que consiste en oligonucleótidos específicos para por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30 o 40 genes de cada una de las especies bacterianas HL-45, HL-27, HL-47, HL-5, HL-51, HL-8, HL-26, HL-3, HL-53, HL-37, HL-13, HL-11, HL-17, HL-23, HL-1 y HL-28.

En otra forma de realización, la micromatriz nucleica es una micromatriz de oligonucleótidos que comprende por lo menos un oligonucleótido específico para por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas HL-31, HL-11, HL-33, HL-28, HL-36, HL-21, HL-22, HL-4, HL-37, HL-45, HL-27, HL-15, HL-51, HL-8 y HL-17. Preferentemente, la micromatriz nucleica es una micromatriz de oligonucleótidos que comprende o que consiste en oligonucleótidos específicos para por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30 o 40 genes de cada una de las especies bacterianas HL-31, HL-11, HL-33, HL-28, HL-36, HL-21, HL-22, HL-4, HL-37, HL-45, HL-27, HL-15, HL-51, HL-8 y HL-17.

En otra forma de realización, la micromatriz nucleica es una micromatriz de oligonucleótidos que comprende por lo menos un oligonucleótido específico para por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas HL-18, HL-56, HL-28, HL-36, HL-45, HL-17, HL-35, HL-33, HL-11, HL-5, HL-8, HL-10, HL-12, HL-25, HL-22, HL-39, HL-49, HL-7 y HL-15. Preferentemente, la micromatriz nucleica es una micromatriz de oligonucleótidos que comprende o que consiste en oligonucleótidos específicos para por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30 o 40 genes de cada una de las especies bacterianas HL-18, HL-56, HL-28, HL-36, HL-45, HL-17, HL-35, HL-33, HL-11, HL-5, HL-8, HL-10, HL-12, HL-25, HL-22, HL-39, HL-49, HL-7 y HL-15.

En otra forma de realización, la micromatriz nucleica es una micromatriz de oligonucleótidos que comprende por lo menos un oligonucleótido específico para por lo menos un gen de cada una de las especies bacterianas HL-47, HL-5, HL-36, HL-37, HL-35, HL-44, HL-11, HL-8, HL-17, HL-31, HL-18, HL-13, HL-21, HL-51, HL-4, HL-28, HL-45, HL-33, HL-3 y HL-15. Preferentemente, la micromatriz nucleica es una micromatriz de oligonucleótidos que comprende o que consiste en oligonucleótidos específicos para por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30 o 40 genes de cada una de las especies bacterianas HL-47, HL-5, HL-36, HL-37, HL-35, HL-44, HL-11, HL-8, HL-17, HL-31, HL-18, HL-13, HL-21, HL-51, HL-4, HL-28, HL-45, HL-33, HL-3 y HL-15.

Dicha micromatriz puede comprender además por lo menos un oligonucleótido para la detección de por lo menos un gen de por lo menos una especie bacteriana de control. Una especie bacteriana conveniente puede ser, p.ej., una especie bacteriana cuya abundancia no varía entre individuos con una diversidad bacteriana reducida e individuos con diversidad bacteriana normal. Preferentemente, los oligonucleótidos presentan una longitud de aproximadamente 50 bases.

Pueden diseñarse oligonucleótidos de micromatriz adecuados específicos para cualquier gen de SEC ID nº 1 a nº 2.900, basados en la secuencia genómica de cada gen, utilizando cualquier procedimiento de diseño de micromatriz de oligonucleótidos conocido de la técnica. En particular, puede utilizarse cualquier software disponible desarrollado para el diseño de oligonucleótidos de micromatriz, tales como, por ejemplo, el software OligoArray (disponible en <http://berry.engin.umich.edu/oligoarray/>), el software GoArrays (disponible en <http://www.isima.fr/bioinfo/goarrays/>), el software Array Designer (disponible en <http://www.premierbiosoft.com/dnamicomicroarray/index.html>), el software Primer3 (disponible en http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_code.html) o el software Promide (disponible en <http://oligos.molgen.mpg.de/>).

La descripción se refiere además a un kit para la determinación in vitro del fenotipo de diversidad bacteriana intestinal reducida, que comprende por lo menos un reactivo para la determinación del número de copia de por lo menos un gen que presenta una secuencia seleccionada de entre las secuencias SEC ID nº 1 y nº 2.900. La expresión "un reactivo para la determinación del número de copia de por lo menos un gen" se refiere a un reactivo que permite específicamente la determinación del número de copia de dicho gen, es decir, un reactivo destinado específicamente a la determinación específica del número de copia de por lo menos un gen que presenta una secuencia seleccionada de entre las secuencias SEC ID nº a nº 2.900. Dicha definición excluye

reactivos genéricos útiles para la determinación del nivel de expresión de cualquier gen, tal como la polimerasa Taq o un tampón de amplificación, aunque dichos reactivos también pueden incluirse en un kit según la descripción. Dicho reactivo para la determinación del número de copia de por lo menos un gen puede ser, por ejemplo, una micromatriz dedicada tal como se ha descrito anteriormente, o cebadores de amplificación específicos para por lo menos un gen que presenta una secuencia seleccionada de entre las secuencias SEC ID nº 1 a nº 2.900. De esta manera, la presente descripción se refiere además a un kit para la determinación in vitro del fenotipo de diversidad bacteriana intestinal reducida, comprendiendo dicho kit una micromatriz dedicada tal como se ha descrito anteriormente o cebadores de amplificación específicos para por lo menos un gen que presenta una secuencia seleccionada de entre las secuencias SEC ID nº 1 a nº 2.900. Además, en el caso de que el kit comprenda cebadores de amplificación, aunque dicho kit puede comprender cebadores de amplificación específicos para otros genes, dicho kit preferentemente comprende como máximo 100, como máximo 75, 50, como máximo 40, como máximo 30, preferentemente como máximo 25, como máximo 20, como máximo 15, más preferentemente como máximo 10, como máximo 8, como máximo 6, todavía más preferentemente como máximo 5, como máximo 4, como máximo 3 o incluso 2 o uno o incluso cero parejas de cebadores de amplificación específicos para otros genes diferentes de los genes de las secuencias SEC ID nº 1 a nº 2.900. Por ejemplo, dicho kit puede comprender por lo menos una pareja de cebadores de amplificación para por lo menos un gen además de los cebadores para por lo menos un gen que presenta una secuencia seleccionada de entre las secuencias SEC ID nº 1 y nº 2.900.

Dicho kit para la determinación in vitro del fenotipo de diversidad bacteriana intestinal reducida puede comprender además instrucciones para la detección de la presencia o ausencia de un fenotipo sensible.

Los inventores han encontrado además que un perfil de microbioma intestinal bajo se encuentra asociado a caracteres subyacentes a trastornos metabólicos.

Los inventores han comparado las características de los sujetos normales, que presentan un recuento génico elevado, y los sujetos con una diversidad bacteriana intestinal reducida, que presentan un recuento génico bajo, y han identificado que los individuos de recuento génico bajo, que constituyen 23% de la población de estudio total, incluían una proporción significativamente más elevada de obesos y se caracterizaban por una adiposidad más marcada, tal como se refleja en un incremento del índice de masa corporal (IMC) y del porcentaje de grasa. Los inventores han encontrado que el fenotipo de adiposidad de los individuos de recuento génico bajo se encontraba asociado a un nivel sérico elevado de leptina, un nivel sérico reducido de adiponectina, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, niveles elevados de triglicéridos y ácidos grasos libres y un fenotipo inflamatorio más marcado (proteína C reactiva (CRP) incrementada y recuento elevado de glóbulos blancos) que el observado en los individuos con recuento génico elevado. El factor adiposo inducido por ayuno (FIAF) circulante se encontraba significativamente elevado en el grupo de recuento génico bajo, también después de ajustar para el IMC. Estos análisis indican que las diferentes fenotípicas entre los individuos con recuento génico bajo y con recuento génico alto eran consistentes con una serie de marcadores de riesgo para trastornos metabólicos tales como la diabetes de tipo II, el síndrome hiperglucémico, enfermedades cardíacas, resistencia a la insulina o estasis hepática.

Por lo tanto, la invención se refiere además a un procedimiento para evaluar el riesgo de un sujeto de desarrollar trastornos metabólicos, preferentemente diabetes de tipo II, síndrome hiperglucémico, enfermedades cardíacas, resistencia a la insulina o estasis hepática, y que comprende las etapas de:

- a) determinar si dicho sujeto presenta una diversidad bacteriana intestinal reducida con un procedimiento de la invención,
- b) en el caso de que el sujeto presenta una diversidad bacteriana intestinal reducida, evaluar el riesgo de que dicho sujeto desarrolle dichos trastornos metabólicos.

Además, es conocido de la técnica que una diversidad bacteriana intestinal reducida se correlaciona con trastornos inmunitarios. En particular, se ha demostrado que una diversidad bacteriana intestinal reducida se encuentra asociada a sensibilidad a patógeno nosocomiales en personas de edad avanzada, asma alérgica en neonatos, dermatitis atópica y diabetes de tipo I.

Por lo tanto, la invención se refiere además a un procedimiento para evaluar el riesgo de un sujeto de desarrollar trastornos inmunitarios, preferentemente sensibilidad a patógenos nosocomiales en personas de edad avanzada, asma alérgica en neonatos, dermatitis atópica o diabetes de tipo I, y que comprende las etapas de:

- a) determinar si dicho sujeto presenta una diversidad bacteriana intestinal reducida con un procedimiento de la invención,
- b) en el caso de que el sujeto presente una diversidad bacteriana intestinal reducida, evaluar el riesgo de que dicho sujeto desarrolle dichos trastornos inmunitarios.

La práctica de la descripción utiliza, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales o química de las proteínas, virología molecular, microbiología, tecnología de ADN recombinante y farmacología, las cuales se encuentran comprendidas dentro de los conocimientos del experto en la materia. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la literatura (ver Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, editores, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1995; Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 17a ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa, 1985, y Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press - Cold Spring Harbor, NY, USA, 1989). Las nomenclaturas utilizadas en relación a, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, biología molecular y celular, bioquímica de las proteínas, enzimología y química medicinal y farmacéutica descritas en la presente memoria son las bien conocidas y utilizadas comúnmente en la técnica.

Tras describir de manera general la presente invención, puede alcanzarse una mayor comprensión de las características y ventajas de la invención haciendo referencia a determinados ejemplos específicos y figuras que se proporciona en la presente memoria con fines ilustrativos únicamente y que no pretenden ser limitativos a menos que se indique lo contrario.

Ejemplos

La abundancia de las bacterias intestinales conocidas se evaluó mediante mapeado de un gran número de lecturas de secuenciación procedentes de ADN fecal total sobre un juego de referencia de sus genomas. Se evaluó la abundancia de los genes del catálogo de referencia de 292 individuos no obesos y obesos.

Población de estudio

Los participantes en el estudio se obtuvieron de la población del estudio Inter99. El estudio Inter99 es un estudio de intervención no farmacológica aleatorizada para la prevención de la enfermedad cardíaca isquémica y fue llevado a cabo en el Research Centre for Prevention and Health in Glostrup, Dinamarca, entre 1999 y 2006 (clinicalTrials.gov: NCT00289237)¹. Los participantes en el estudio Inter99 fueron examinados en la línea base, y después de 1, 3 y 5 años, según el tipo de intervención.

Para el estudio, se seleccionaron aleatoriamente de los registros aquellos individuos con índice de masa corporal (IMC) inferior a 25 kg/m² o IMC superior a 30 kg/m² en el año 5 del estudio Inter99. No presentaban ninguna enfermedad gastrointestinal conocida, sin cirugía bariátrica previa, sin medicaciones de efecto conocido sobre el sistema inmunológico y sin antibióticos en los dos meses anteriores a la recolección de muestras fecales. Se excluyeron los individuos que presentaban diabetes de tipo 2 en el día del examen. En total se incluyeron en el protocolo 292 individuos no diabéticos. Todos presentaban etnicidad del norte de Europa. En el tiempo del examen físico mismo, 96 (33%) de los voluntarios del estudio eran delgados, con IMC <25 kg/m², 27 (9%) presentaban sobrepeso, con IMC de entre 25 y 30 kg/m², y 169 (58%) eran obesos, con IMC >30 kg/m² según la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS)². El estudio fue aprobado por los comités éticos locales de la región de la capital de Dinamarca (HC-2008-017) y era conforme a los principios de la Declaración de Helsinki. Todos los individuos proporcionaron su consentimiento informado por escrito antes de participar en el estudio.

Fenotipado

Los participantes fueron examinados en dos días diferentes, separados por aproximadamente 14 días. El primer día, los participantes fueron examinados por la mañana después del ayuno de la noche. Se midió la altura sin zapatos con una precisión de hasta 0,5 cm y se midió el peso sin zapatos y ropa ligera con una precisión de hasta 0,1 kg. Se registró la circunferencia de la cadera y de la cintura utilizando una cinta medidora no expandible con una precisión máxima de 0,5 cm. Se midió la circunferencia de la cintura a medio camino entre el margen de la costilla más inferior y la cresta ilíaca. Se midió la circunferencia de la cadera como la circunferencia más grande entre la cintura y los muslos. El segundo día del examen todos los participantes proporcionaron una muestra de heces recogida domésticamente y se llevó a cabo una absorciometría de rayos X de emisión dual (DXA). Los análisis de los datos y escaneo de DXA se llevaron a cabo con el software integrado (Hologic Discovery A, Santax, USA). Se midió la altura sagital en el tiempo del escaneo de DXA utilizando el calibrador abdominal Holtain-Kahn en el punto más alto del abdomen con el participante en posición supina y en espiración. Los participantes que estaban recibiendo estatinas, fibras y/o ezetimiba se informaron como receptores de medicación reductora de lípidos.

Medidas e índices antropométricos derivados de resistencia a la insulina y de la función de las células beta pancreáticas

Se calculó el tejido adiposo intraabdominal (TAIA, cm²) utilizando datos de los escaneos de DXA y la antropometría aplicando la ecuación³ siguiente: $y = -208,2 + 4,62 (\text{diámetro sagital, cm}) + 0,75 (\text{edad, años}) + 1,73 (\text{cintura, cm}) + 0,78 (\text{grasa del tronco, \%})$ ³. Se calculó la evaluación del modelo homeostático de resistencia a la insulina (HOMA-IR) como: $(\text{glucosa plasmática en ayuno (mmoles/l)}) * (\text{insulina sérica en ayuno (mU/l)}) / 22,5$ ⁴.

Mediciones bioquímicas

Todos los análisis se llevaron a cabo en muestras de sangre extraídas por la mañana después del ayuno de la noche desde por lo menos las 10 de la tarde anterior.

Se analizó la glucosa plasmática mediante un procedimiento de glucosa oxidasa (Granutest, Merck, Darmstadt, Alemania) con un límite de detección de 0,11 mmol/l y coeficientes intraensayo e interensayo de variación (CV) de <0,8% y <1,4%, respectivamente. Se midió HbA1c en TOSOH G7 mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio iónico.

Se midió la insulina sérica (excluyendo la proinsulina intacta) utilizando el kit de insulina AutoDELFIA (Perkin-Elmer, Wallac, Turku, Finlandia) con un límite de detección de 3 pmol/l y con un CV intraensayo e interensayo de <3,2% y <4,5%, respectivamente. Se midió el nivel plasmático de colesterol total, de colesterol-HDL y de triglicéridos en un instrumento Vitros 5600 utilizando espectrofotometría de reflexión. Se midieron los leucocitos sanguíneos y el recuento diferencial de glóbulos blancos en un instrumento Sysmex XS 1000i mediante citometría de flujo. Se analizaron los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) plasmática y de ácidos grasos libres totales en plasma utilizando procedimientos bioquímicos estándares (Modular Evo). Se analizó la proteína C reactiva altamente sensible (hs-CRP) plasmática mediante un ensayo inmunoturbidimétrico potenciado por partículas en MODULAR Evo utilizando el kit CRPL3 (Roche, Mannheim, Alemania) con un límite de detección de 0,3 mg/l y CV intraensayo e interensayo de <4,0% y 6,2%, respectivamente.

Se analizó la adiponectina plasmática utilizando un kit ELISA de tipo sándwich de dos sitios para medir la adiponectina humana total (TECO, Sissach, Suiza). El límite de detección era 0,6 ng/ml y el CV interensayo e intraensayo era de <6,72% y <4,66%, respectivamente. El factor adiposo inducido por ayuno (FIAF), también denominado factor similar a la angiopoyetina-4 humana (ANGPLT4) se midió utilizando un ELISA de tipo sándwich cuantitativo (Adipo Bioscience, Santa Clara, USA). El límite de detección era 0,6 µg/l y los CV interensayo e intraensayo eran de 8% y 4%, respectivamente. Se analizó la proteína ligante de lipopolisacárido utilizando un kit ELISA de tipo sándwich en fase sólida (Abnova) con un CV interensayo <17,8% y un CV intraensayo <6,1%. Se analizó la IL-6 sérica y el TNF-alfa sérico mediante Luminex utilizando el ensayo de citoquinas Bio-Plex Pro (Bio-Rad), mientras que la leptina sérica se midió utilizando el ensayo de diabetes Bio-Plex Pro.

Muestreo fecal

Se obtuvieron muestras de heces en los domicilios de cada participante y las muestras se congelaron inmediatamente mediante almacenamiento en el congelador doméstico. Las muestras congeladas fueron enviadas al Steno Diabetes Center utilizando envases de espuma de poliestireno aislantes y se almacenaron a -80°C hasta el análisis. Se apuntó a un periodo de tiempo lo más corto posible entre el muestreo y el envío al Steno Diabetes Center y en todo caso no superior a 48 horas.

Extracción del ADN

Se suspendió una alícuota congelada (200 mg) de cada muestra fecal en 250 µl de tiocianato de guanidina, Tris 0,1 M (pH 7,5) y 40 µl de N-lauroilsarcosina al 10%. A continuación, se llevó a cabo la extracción del ADN tal como se ha descrito anteriormente^{4,5}. Se estimaron la concentración del ADN y su tamaño molecular mediante nanodrop (Thermo Scientific) y en electroforesis en gel de agarosa.

Secuenciación con Illumina

La preparación de la biblioteca de ADN se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (Illumina). El flujo de trabajo indicado por el proveedor se utilizó para llevar a cabo la generación de agrupaciones, la hibridación de moldes, la amplificación isotérmica, la linearización, el bloqueo y la desnaturalización e hibridación de los cebadores de secuenciación. Se utilizó el proceso de asignación de bases (versión IlluminaPipeline-0.3) para procesar las imágenes fluorescentes en bruto y las secuencias asignadas.

Se construyó una biblioteca (tamaño del clon insertado: 200 pb) para cada muestra del primer lote de 15 muestras; dos bibliotecas con diferentes tamaños de clon insertado (135 pb y 400 pb) para cada muestra del segundo lote de 70 muestras y una biblioteca (350 pb) de cada muestra del tercer lote de 207 muestras.

Tras la secuenciación, se llevó a cabo el control de calidad y se cribaron los contaminantes de genoma humano. Finalmente, se generaron 26,0 a 186,1 millones de lecturas de alta calidad para las 292 muestras, con una media de 68,2 millones de lecturas de alta calidad. La longitud de lectura de secuenciación del primer lote de 15 muestras era de 44 pb; en el segundo lote era de 75 pb y en el tercer lote era de 75 pb y 90 pb.

Localización de las lecturas de secuencia en los genes de catálogo

Se alinearon las lecturas cortas de alta calidad con el catálogo génico utilizando SOAP2.21⁶ permitiendo como máximo dos no correspondencias en la primera región de 35 pb y una identidad de 90% respecto a la secuencia de la lectura. El resultado de la alineación se filtró y se contaron las parejas de mapeado único (lecturas de extremo emparejado) para cada gen en cada muestra. Con el fin de utilizar razonable y suficientemente el resultado de la alineación, algunas lecturas de extremo emparejado, un extremo de las cuales se localizaba en el extremo de un gen mientras que el otro faltaba aunque se esperaba localizarlo en la región génica no ensamblada o región no codificante, se trataron como alineaciones de extremo emparejado correctas.

Recuento génico

Basándose en el resultado del recuento orientado a parejas de cada muestra, se seleccionó un umbral de 1 lectura para la identificación génica, para incluir los genes raros en el análisis. Se identificaron 91.032 a 1.005.488 genes para las 292 muestras, con una media de 670.528 genes.

Reducción del tamaño de las lecturas

Con el fin de eliminar la influencia de la fluctuación de la secuenciación, los resultados de alineación se muestrearon y el número de parejas mapeadas se redujo a 11 millones para cada muestra. Después, se encontraron 59.147 a 878.816 genes para las 292 muestras, con una media de 578.512 genes.

Estimación de la diversidad mediante la puntuación de genes de copia única

Los genes pertenecientes a los grupos ortólogos COG0085, COG0525 y COG0090 de 3.515 genomas procarióticos se agruparon en unidades taxonómicas operativas (UTO) con una identidad de 95% utilizando UCLUST (Edgar, 2010) y se utilizaron como base de datos de referencia. Las lecturas de extremo emparejado de Illumina procedentes de 292 muestras metagenómicas se mapearon con un valor de corte de identidad de 95% utilizando el programa soap2.21⁶. Los números de fragmentos que se habían asignado a las secuencias de referencia se contaron de manera que el peso de cada fragmento fuese igual a 1, es decir, un fragmento asignado a N secuencias de referencia diferentes contribuye 1/N a cada secuencia de referencia. Los recuentos de fragmentos de secuencias de referencia se agruparon para rendir los recuentos de UTO. Las muestras con bajo esfuerzo de muestreo, es decir, con menos de 3.000 fragmentos localizados en genes de referencia fueron eliminadas, dejando 229 muestras para los análisis comparativos. Los recuentos de UTO se normalizaron respecto a la longitud génica, se escalaron según el recuento máximo en todos los genes marcadores y se submuestrearon utilizando el paquete Vegan⁷ hasta la suma mínima de recuentos de UTO en todas las muestras con el fin de comparar la riqueza de especies entre los grupos de alto contenido y bajo contenido génico.

Análisis filogenético de micromatrices

Se llevaron a cabo análisis de micromatriz HITChip tal como se ha descrito anteriormente⁸. Brevemente, se amplificaron genes de ARNr 16S con los cebadores T7prom-Bact-27-for y Uni-1492-rev a partir de extractos de ADN fecal. En dichos amplicones, se llevó a cabo la transcripción in vitro y el posterior marcaje con los pigmentos Cy3 y Cy5. El ARN marcado se fragmentó y se hibridó sobre las matrices a 62,5°C durante 16 h en un horno giratorio (Agilent Technologies, Amstelveen, Países Bajos). Las matrices se lavaron, se secaron, se escanearon y se extrajeron los datos de intensidad de señal tal como se ha descrito (<http://www.agilent.com>). La normalización de los datos de las micromatrices y el análisis se llevaron a cabo con un juego de secuencias de comandos basadas en R (<http://r-project.org>), utilizando simultáneamente una base de datos diseñada al efecto que funcionaba con el sistema de gestión de bases de datos MySQL (<http://www.mysql.com>).

De las 3.699 sondas de HITChip únicas, se seleccionaron las sondas que explicaban el 99,9% superior de la señal total. Se contaron dichas sondas para cada muestra para medir la riqueza, y eran de entre 713 y 1.597 sondas por muestra. Las sondas que explicaban el 0,1% más bajo de la señal total se consideraron ruido de fondo y no fueron incluidas en el análisis posterior. Se utilizaron los valores de la señal de las sondas para calcular el índice de diversidad de Simpson inverso para cada muestra.

La especificidad de las sondas de HITChip puede asignarse a tres niveles filogenéticos basándose en la similitud de las secuencias génicas de ARNr 16S: grupos de tipo orden, grupos de tipo género (similitud de secuencia > 90%) y grupos de tipo filotipo (similitud de secuencia > 98%)⁸. Se calcularon las abundancias relativas para cada nivel de especificidad sumando todos los valores de señal de las sondas con diana en un grupo y dividiendo por el total de señales de sonda para la muestra correspondiente. Se evaluaron todas las comparaciones entre los individuos de ARG y de BRG con ensayos de rangos con signo de Wilcoxon de 2 grupos dependientes. Al llevar a cabo los ensayos estadísticos en un gran número de variables, se ajustaron los valores de p obtenidos mediante una corrección de Bonferroni. Para situar la especie de recuento génico y marcador IMC (HL y oble, respectivamente) en la filogenia de HITChip, se calcularon los coeficientes de correlación de Spearman entre las frecuencias de perfilado metagenómico y las abundancias relativas de los grupos de tipo filotipo en las 251

muestras. Se utilizó un umbral de 0,7 para asociar 16S a una especie.

Análisis metagenómico de micromatrices

Se diseñó y fabricó una micromatriz NimbleGen de Roche al efecto de 2,1 millones de características con diana en un subgrupo de 700.000 genes del catálogo génico del intestino humano MetaHit⁹. El subgrupo de genes se priorizó para genes que se observaron en más de 20 de las 124 muestras del catálogo génico. El ADN extraído de las muestras fecales se marcó y se hibridó según los protocolos estándares de NimbleGen. Se preprocesaron los datos y se calculó el índice de diversidad de Shannon utilizando la implementación RMA bajo el paquete "oligo" y el paquete "Vegan"⁷, respectivamente, ambos disponibles en el entorno R de programación estadística.

Con el fin de validar los biomarcadores observados para recuentos génicos bajos/altos encontrados mediante secuenciación, se compararon los datos con señales de micromatrices de ADN para las mismas muestras e individuos. De esta manera, se compararon los genes trazadores para las especies conocidas y desconocidas en la figura 2 con un juego de genes de micromatriz que comprendía más de 700.000 genes asociados al intestino seleccionados del catálogo génico MetaHit⁹ además de los genomas de referencia. Se encontraron correspondencias perfectas para 129 genes trazadores en la micromatriz de ADN. Con el fin de someter a ensayo si podía obtenerse una discriminación similar a partir de los datos de micromatriz, las muestras se dividieron en grupos de baja y alta diversidad utilizando el índice de diversidad de Shannon. Utilizando este índice, se clasificaron 90 muestras como de baja diversidad, mientras que 70 fueron clasificadas como de alta. Las diferencias en las señales de abundancia de ADN entre las muestras de baja y alta diversidad se sometieron a ensayo para los 129 genes correspondiente (prueba t). En resumen, en términos de especies los grupos siguientes se asociaron a alta diversidad: *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium bolteae*, HL-7, HL-39, *Ruminococcus gnavus*, HL-15, HL-20 y *Bacteroides*, mientras que HL-53 y *Methanobrevibacter smithii* se asociaron a baja diversidad. Dichas observaciones de micromatrices de ADN corroboran los resultados metagenómicos cuantitativos (figura 2, Tablas 7 y 7b).

Enterotipado

Para cada muestra microbiana intestinal, las lecturas de Illumina se localizaron en un grupo de 1.506 genomas de referencia para registrar las abundancias de género basándose en la taxonomía de Bergey. Se llevó a cabo un análisis de coordenadas principales utilizando la distancia JSD y se asignaron los enterotipos a cada muestra tal como se describe en¹⁰.

Anotación filogenética

La asignación taxonómica de los genes predichos para el análisis global se llevó a cabo utilizando BLASTN para asignar las lecturas a una base de datos de genoma de referencia en un valor de corte de 95% de identidad de secuencia y >100 pb de solapamiento, a menos que se indique lo contrario. Se utilizó dicha asignación como asignación de alta confianza a nivel de especie. Como base de datos de referencia los presentes inventores utilizaron 1.869 genomas de referencia disponibles del NCBI y el juego de genomas gastrointestinales de borrador del DACC (<http://hmpdacc.org/>), ambos del 15.7.2011. Las lecturas asignadas a cada grupo taxonómico por muestra se rarificaron a 5,5 millones de genes (el tamaño de la muestra más pequeña); en dicha matriz rarificada se sometieron a ensayo los grupos taxonómicos para diferencias significativas de abundancia utilizando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon. Se llevó a cabo una corrección para múltiples ensayos mediante el control de la tasa de falso descubrimiento ($q < 0,05$) utilizando el procedimiento de Benjamini-Hochberg¹¹.

Anotación funcional

Se utilizó BLASTP para buscar las secuencias de proteínas de los genes predichos en la base de datos eggNOG¹² y en la base de datos KEGG¹³ con valor $e \leq 1 \times 10^{-5}$ tal como se describe en⁹ y el NOG/KEGG OG del mejor acierto se asignó a cada gen. Los genes anotados por COG se clasificaron en 25 categorías COG y los genes que habían sido anotados por KEGG se asignaron a un juego de módulos metabólicos intestinales determinados manualmente [Falony et al., en prep.]. La abundancia relativa de ruta/módulo de las categorías funcionales de orden superior se calcularon a partir de las abundancias KO rarificadas. Los módulos se consideraron presentes en el caso de que se recuperase $\geq 30\%$ de los enzimas, tras la eliminación manual de enzimas excesivamente "promiscuos" (es decir, presentes en múltiples módulos) antes del cálculo de la abundancia. Para las asignaciones funcionales de nivel superior, se sumaron las abundancias KO y se distribuyeron uniformemente en el caso de que los KO apareciesen en múltiples categorías. Se calcularon las diferencias funcionales con una prueba de suma de rangos de Wilcoxon y se llevó a cabo una corrección por múltiples ensayos mediante el control de la tasa de falso descubrimiento ($q < 0,05$) utilizando el procedimiento de Benjamini-Hochberg¹¹.

Genes significativamente diferentes en grupos de individuos

Los genes significativamente diferentes en grupos de individuos se identificaron mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon acoplada a un enfoque de 'bootstrapping'.

El 70% de la cohorte completa (204 individuos) se seleccionó aleatoriamente y los genes diferencialmente abundantes en individuos de BRG y de ARG se identificaron con $p \leq 0,0001$ como umbral. Se repitió este ensayo 30 veces. Se compusieron 30 grupos de individuos "extremos" seleccionados aleatoriamente que presentaban <400.000 genes o >600.000 genes y se aplicó la misma prueba a los mismos. Se analizaron adicionalmente los genes comunes a la totalidad de las 60 pruebas.

Para los individuos delgados y obesos de la población total o estratificados según enterotipo, se utilizó un enfoque similar mediante la selección aleatoria de 70% de los individuos 30 veces y utilizando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon con $p \leq 0,05$.

Agrupación de genes y abundancias de especies

Debido a que sólo una parte pequeña ($<10\%$) de los genes recuperados como significativamente diferente en dos grupos de individuos pudo asignarse taxonómicamente a partir de la similitud de las secuencias con genomas de referencia conocidos, se utilizó una estrategia alternativa para agrupar los genes de la misma especie. Se esperaba que dichos genes se encontrasen presentes a una abundancia similar en un individuo pero a abundancias muy diferentes en diferentes individuos. De esta manera, los genes que varían en abundancia de una manera coordinada es probable que procedan de la misma especie. Los genes se agruparon según una estrategia de agrupación basada en el perfil, utilizando la covarianza de sus perfiles de recuento entre los 292 individuos de la cohorte. Se determinaron los coeficientes de correlación de Spearman por parejas y todos los genes que se correlacionaban a un nivel superior a un umbral dado se asignaron a la misma agrupación.

La abundancia de una especie dada en cada individuo se estimó como abundancia promedio de 50 genes 'trazadores' de cada agrupación. Los valores eran muy próximos a la frecuencia media de todos los genes de una agrupación.

Análisis de características de receptor-operador (ROC)

Se llevaron a cabo análisis para distinguir entre los individuos de ARG y BRG o individuos delgados y obesos mediante una combinación de especies bacterianas. Para cada combinación, sólo se consideró un único modelo de decisión. En este modelo de regresión muy específico, sólo se permiten ponderaciones para la inclusión de valores. Más exactamente, el peso de cada especie en una combinación dada que pertenece al juego de especies más frecuente en un grupo es igual a 1 mientras que la de la especie que pertenece al juego de especies más frecuente en el otro grupo es igual a -1. El peso de cada especie que se encuentra fuera de la combinación es 0. Para cada individuo, dicho modelo rinde una puntuación que se denomina puntuación de abundancia bacteriana decisiva. Al contrario que el número infinito de modelos de regresión, dichos modelos ternarios son finitos y pueden explorarse exhaustivamente. Para seleccionar los mejores modelos, se utilizó el criterio de área de validación cruzada bajo la curva ROC¹⁴, ya que se encuentra bien adaptado a modelos de clasificación para datos de resultados binarios.

Especies correlacionadas con el cambio de IMC

Para la cohorte entera de 292 individuos, se compararon los 40 individuos (14%) con la abundancia más elevada de una especie con por lo menos 125 individuos (42%) con la abundancia más baja (se incluyeron todos los individuos que no presentaban una especie, en el caso de que el número de individuos fuese superior a 125); se seleccionaron estos números para que permitiesen la comparación de los extremos de la distribución y mantuviesen simultáneamente un tamaño de muestra suficientemente elevado para reducir la probabilidad de una diferencia fortuita en el cambio de IMC. Para los 169 individuos obesos, se compararon los 30 (18%) con la abundancia más alta de una especie con por lo menos 60 individuos (36%) con la abundancia más baja (se incluyeron todos los individuos que no presentaban una especie, en el caso de ser más numerosos de 60). Se calcularon las diferencias con una prueba t de Student; los cambios de IMC presentaban una distribución normal, y la corrección por múltiples ensayos se llevó a cabo mediante el control de la tasa de falso descubrimiento ($q < 0,05$) utilizando el procedimiento de Benjamini-Hochberg¹¹.

Asociación de la composición microbiana y caracteres metabólicos

Los presentes inventores analizaron la asociación de 1) el grupo de alto contenido génico y de bajo contenido génico y 2) el recuento génico como carácter continuo para cuantificar los caracteres mediante la aplicación de un modelo lineal ajustando para edad y sexo.

Las correlaciones entre los caracteres cuantitativos se muestran en la figura 15. P-triglicéridos, P-colesterol-HDL,

S-insulina, P-ALT, P-leptina y P-adiponectina y HOMA-IR fueron transformados logarítmicamente, mientras que B-leucocitos, B-linfocitos, B-monocitos, B-neutrófilos, P-hsCRP, S-FIAF, P-ácidos grasos libres, S-TNF-alfa, S-IL-6, S-proteína ligante de lipopolisacárido e IMC se normalizaron según rangos antes de los análisis en el modelo lineal. en los análisis de triglicéridos, se añadió el tratamiento con medicación reductora de lípidos como covariable al modelo lineal.

Los datos se corrigieron para múltiples ensayos mediante el procedimiento de Benjamini-Hochberg¹¹, fijando la tasa de falso descubrimiento (TFD) en 10%. Se muestran los resultados en la Tabla 14.

Para los análisis por parejas del enterotipo con fenotipos, se aplicó un modelo lineal que ajustaba para edad y sexo. Se utilizó el procedimiento de Benjamini-Hochberg¹¹ para corregir para múltiples ensayos aplicado a las tres comparaciones por parejas, fijando nuevamente la tasa de falso descubrimiento (TFD) en 10%. Se muestran los resultados en la Tabla 15.

Perfilado de abundancias de genes microbianos mediante metagenómica cuantitativa

Se determinó el contenido de genes bacterianos intestinales de los individuos incluidos mediante secuenciación basada en Illumina de alto rendimiento del ADN fecal total. Se produjo una media de 34,1 millones de lecturas de extremos emparejados para cada muestra y, tras eliminar la contaminación humana (~0,1%, de media), se localizaron $19,9 \pm 6,7$ (s.d.) millones de lecturas en una única posición del catálogo de referencia de 3,3 millones de genes, requiriendo una identidad >90%²²; las lecturas localizadas en múltiples posiciones (13,4%, de media) fueron descartadas. Se estimó la abundancia de un gen en una muestra dividiendo el número de lecturas localizadas exclusivamente en ese gen por la longitud génica y por el número total de lecturas procedentes de la muestra que se localizaban exclusivamente en cualquier gen en el catálogo. El juego resultante de abundancias génicas, denominado perfil génico microbiano de un individuo, se utilizó para los análisis posteriores.

Una distribución bimodal de los genes microbianos

La comparación de los perfiles génicos en la muestra de estudio total de 292 individuos mostró una distribución bimodal de los genes bacterianos (figura 1, a y b, y Tabla 4). El 27% de los individuos presentaba <590.000 genes, mientras que el resto presentaba un número superior. Lo anterior resultó todavía más claro entre individuos obesos, mientras que se observó una distribución amplia, posiblemente multimodal, en los individuos no obesos (es decir, con sobrepeso y delgados). Los presentes inventores creen que un mejor conocimiento de la estructura fina de la distribución génica para estos últimos podría obtenerse analizando un número más elevado de individuos. Sin embargo, los individuos no obesos también mostraron un "hombro" en <590.000 genes, que comprendía el 20% de dicho grupo. Se observó una distribución similar en individuos obesos franceses utilizando una tecnología de secuenciación diferente (Cotillard et al., artículo acompañante). Debido a que el número de genes detectado aparentemente presentaba cierta dependencia del número de lecturas emparejadas (figura 4), los presentes inventores compararon individuos que presentaban el mismo número de lecturas. Se utilizó una reducción de tamaño a 11 millones de lecturas y se excluyeron 15 individuos (5,1%) con menos lecturas localizadas. Se observó nuevamente una distribución bimodal, tanto para la totalidad de los individuos como para los individuos obesos (figura 1 y Tabla 4). Los presentes inventores en lo sucesivo denominan a los individuos con <480.000 genes, de "bajo recuento génico" (BRG) y a los demás, de "alto recuento génico" (ARG). Presentaban, de media, 380.000 y 640.000 genes, una diferencia de aproximadamente 40% y alojaban una flora más o menos rica, respectivamente, tal como muestra la puntuación de varios genes marcadores de copia única. El análisis de HITChip²⁴, basado en el marcador filogenético ampliamente aceptado ARNr 16S, confirmó tanto la distribución bimodal como la diferencia de riqueza de las comunidades microbianas entre los individuos de BRG y de ARG (figura 5).

Se ha informado de una baja riqueza de la flora intestinal en pacientes con trastorno intestinal inflamatorio (TII) 22,25,26 y en individuos obesos 17, aunque las diferencias de riqueza en estos grupos o entre individuos no obesos no había sido detectada anteriormente. Debido a que la composición de la flora intestinal aparentemente es bastante estable durante largos periodos de la adultez²⁷, su riqueza podría ser perfectamente un rasgo característico de un individuo. En ratones, la riqueza aparentemente resulta afectada por los tratamientos antibióticos repetidos (M.J. Blaser, comunicación personal); la genética del huésped también podría tener una influencia, tal como ejemplifica la desactivación del receptor 5 de tipo Toll, que resulta en una flora intestinal alterada y síndrome metabólico, un fenotipo transmisible por trasplante fecal de la flora alterada²⁸. Estudios adicionales, centrados específicamente en la riqueza de la flora intestinal en cohortes amplias como función del comportamiento, incluyendo la ingesta de alimento, el ejercicio, los hábitos tabáquicos, otros contaminantes y la medicación durante periodos suficientemente prolongados podría ayudar a aclarar las causas de su variabilidad.

Los presentes inventores han determinado el enterotipo de los individuos en la cohorte de los presentes inventores y han encontrado que la distribución de enterotipos varía mucho con el recuento génico (figura 1). Sorprendentemente, el 81,3% de los individuos de BRG pertenecían al enterotipo 1 regulado por *Bacteroides*, mientras que el 63,4% de los individuos de ARG pertenecían al enterotipo 3, en el que se había demostrado que *Ruminococcus* se encontraba sobrerrepresentado pero que se correlaciona incluso mejor con

Methanobrevibacter en la presente base de datos, de mayor tamaño. Esta distribución era significativamente diferente ($\chi^2=5 \times 10^{-22}$) de la esperada de la distribución de enterotipos en la muestra de estudio total (29,2% de *Bacteroides* y 51% de enterotipos regulados por *Methanobrevibacter*).

5 Los individuos de ARG y de BRG difieren en especies bacterianas conocidas

Tanto la diferencia de número génico como la estratificación según enterotipo indican que los individuos de ARG y de BRG alojan diferentes comunidades microbianas. Con el fin de evaluar la diferencia de composición filogenética entre las dos, los presentes inventores combinaron el mapeado del genoma de referencia con los datos de abundancias génicas a nivel de filo, género y especie.

Los presentes inventores en primer lugar examinaron la composición filogenética general a niveles taxonómicos más elevados basándose en las abundancias de lecturas normalizadas según el tamaño genómico que se localizaron en los genomas de referencia disponibles públicamente y se agruparon al nivel de género y de filo. 39 géneros diferían significativamente en abundancia en individuos de ARG y de BRG. Mientras que *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Ruminococcus* (específicamente *R. torques* y *R. gnavus*, de la agrupación *Clostridium* XIV), *Campylobacter* y *Anaerostipes* eran más dominantes con BRG, 31 géneros, incluyendo *Butyrivibrio*, *Alistipes*, *Akkermansia*, *Coprococcus* y *Methanobrevibacter*, se encontraban significativamente asociados a ARG. Al nivel de filo, este cambio filogenético ha resultado en una abundancia más alta de proteobacterias y *Bacteroidetes* en individuos de BRG frente a poblaciones incrementadas de *Verrucomicrobia* y *Euryarchaeota* en individuos de ARG. Una abundancia incrementada de *Bacteroides* en los individuos de BRG es congruente con la dominancia del enterotipo regulado por *Bacteroides* en este grupo. En aras de la claridad, debe mencionarse que el *Ruminococcus* prevalente en los individuos de ARG y el enterotipo *Ruminococcus/Methanobrevibacter smithii* aparentemente es del grupo similar a *R. bromii* de la agrupación *Clostridium* IV (resultados de HITChip, datos no mostrados).

A continuación, los presentes inventores estudiaron las especies específicas que eran diferencialmente abundantes en individuos de BRG y de ARG. Con este fin, los presentes inventores utilizando un nuevo enfoque genocéntrico que permite la visualización de patrones basados en individuos y evita artefactos de la cobertura incompleta del genoma. En este enfoque, los presentes inventores identificaron los genes que eran significativamente diferentes en individuos de BRG y de ARG mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon, comparando 204 (70% del total) individuos seleccionados aleatoriamente 30 veces. De manera similar, los presentes inventores compararon 126 individuos "extremos", que alojaban <400.000 genes o >600.000 genes. Se encontraron 120.726 genes en la totalidad de los 60 ensayos con $p < 0,0001$ y se analizaron adicionalmente.

Los presentes inventores buscaron genes que podrían pertenecer a la misma especie, comparándolos con todos los genomas secuenciados. A un umbral de 95% de identidad a lo largo de por lo menos 90% de la longitud génica, se asignaron 10.225 genes (8,5%) a un total de 97 genomas representantes de unas 73 especies (Tabla 5). Sin embargo, una amplia mayoría (93,4%) pertenecía a sólo 9 especies, la totalidad de las cuales eran *Firmicutes*, con una única excepción del metanógeno humano principal, *M. smithii*. La especie correspondiente variaba significativamente en abundancia en individuos de BRG y ARG, tal como se ilustra en la figura 2, en la que se muestra la presencia y abundancia de 50 genes seleccionados arbitrariamente de cada una de las 9 especies en los individuos de la cohorte. Los presentes inventores sugieren que dichos genes pueden utilizarse como "trazadores" de una especie en cualquier individuo, ya que presentan una distribución claramente bimodal - el 70% de los individuos presentaba la totalidad o ninguno de los genes de una especie y, de esta manera, alojaba o no presentaba esa especie. Las primeras 5 especies eran más frecuentes en individuos de BRG, mientras que las últimas 4 especies eran más frecuentes en el grupo de ARG (figura 2).

Conjuntamente los análisis subrayan el análisis entre la distribución de especies antiinflamatorias, tales como *Faecalibacterium prausnitzii*, que son más prevalentes en los individuos de ARG y potencialmente proinflamatorios, *Bacteroides* y *R. gnavus*, asociados a TII y observados más frecuentemente en individuos de BRG.

Sin embargo, una amplia mayoría (>90%) de los 120.723 genes con abundancias significativamente diferentes en los individuos de BRG y de ARG no pudieron asignarse a un genoma bacteriano secuenciado, ya que la base de datos del genoma intestinal de referencia todavía no se ha completado. Estos genes también deben pertenecer a especies bacterianas que se encuentran presentes en abundancias diferentes en los dos tipos de individuos. De esta manera, los presentes inventores intentaron agrupar los genes de la misma especie según un enfoque basado en las abundancias génicas.

Los individuos de ARG y de BRG difieren en las especies bacterianas desconocidas

Los presentes inventores plantearon la hipótesis de que los genes de una especie bacteriana dada deberían encontrarse presentes a una abundancia similar en un individuo pero deberían mostrar grandes variaciones en la cohorte, ya que es conocido que la abundancia específica varía muchísimo entre individuos (en un factor de 10 a

10.000)²². De esta manera, los genes que varían en abundancia de manera coordinada es probable que procedan de la misma especie. Los presentes inventores sometieron a ensayo dicha hipótesis para 10.225 genes asignados taxonómicamente que diferían significativamente en individuos de BRG y de ARG mediante el cálculo de los coeficientes de correlación de Spearman para cada gen con todos los demás genes y agrupando aquellos que se encontraban correlacionados sobre un umbral dado. Se encontraron noventa y dos agrupaciones que contenían por lo menos 2 genes y que incluían colectivamente 8.594 genes (84% del total) en un umbral de coeficiente de Spearman de 0,75. Una amplia mayoría de ellos (8.125, 94,5%) se agrupaban en sólo 8 grupos que incluían las 9 especies más altamente representadas mostradas en la figura 2 (los genes asignados a los genomas de *Clostridium bolteae* y de *C. clostridioforma* se encontraban en la misma agrupación). La especificidad (proporción de los genes de la misma especie) y la sensibilidad (proporción de los genes de una especie incluida en una agrupación) de la agrupación era muy elevada (media de 97,8% y 91,8%, respectivamente) para 7 de las agrupaciones. La especificidad de las 7 mejores agrupaciones se incrementó a 99,5% a un umbral más alto (coeficiente de Spearman de 0,85), con una reducción concomitante de la sensibilidad a 55,9%. Los presentes inventores concluyeron que el análisis de la covarianza agrupa eficientemente los genes de la mayoría de las especies taxonómicamente caracterizadas altamente representadas y lo utilizaron para agrupar todos los genes significativamente diferentes que había revelado el análisis de suma de rangos de los presentes inventores.

Se agruparon 76.564 genes (63% de 120.723) en 1.440 agrupaciones de 2 genes o más a un umbral de 0,85, y se utilizó para favorecer la especificidad de la agrupación, aunque una amplia mayoría (68.952, 90%) se encontró en sólo 58 agrupaciones que contenía >75 genes. Incluían 6 de las 9 especies caracterizadas taxonómicamente que se muestran en la figura 2, que agrupaba un total de 2.530 genes (3,7%) y se agrupaban con una especificidad media de 92% (comprendida entre 85,9% y 99,1%). Es algo inferior a los valores observados al agruparon 10.225 genes asignados taxonómicamente; posiblemente algunos de los genes de estas especies no se encontraban en los genomas de referencia secuenciados y, de esta manera, no habían sido asignados taxonómicamente. Una mayoría de las demás agrupaciones que agrupaba >75 genes sin clara asignación taxonómica debería contener genes de especies previamente desconocidas, a una especificidad elevada similar. Con el fin de someter a ensayo esta suposición, los presentes inventores correlacionaron las secuencias génicas del ARNr 16S representadas en el HITChip con dichas agrupaciones. Con este fin, se comparó la abundancia de cada agrupación, calculada como abundancia media de 50 genes trazadores seleccionados arbitrariamente, con la señal de hibridación de cada una de las sondas contenidas en el HITChip en los individuos de la cohorte de los presentes inventores. Las secuencias génicas del ARNr 16S se correlacionaba con 3 de las 6 agrupaciones de taxonomía conocida de manera congruente y con 24 de las 52 agrupaciones de taxonomía desconocida; la totalidad de las últimas eran de especies desconocidas. Para las 28 agrupaciones restantes resulta posible que la resolución de HITChip de genomas estrechamente relacionados pueda haber resultado insuficiente o que no se encontrasen presentes las secuencias de 16S correspondientes. Los presentes inventores concluyeron que el procedimiento de agrupación agrupaba los genes de la misma especie.

La distribución de especies desconocidas en individuos de BRG y de ARG de la cohorte se encontraba claramente sesgada, tal como se ilustra para 7 de ellos con 50 genes trazadores (figura 2). Los genes de 10 de las especies y *Bacteroides* se encontraban presentes en las matrices metagenómicas; en todos los casos, el sesgo ARG/BRG observado mediante secuenciación también se detectó mediante las matrices (figura 2). Resultará necesaria la caracterización de las especies desconocidas para evaluar más completamente el impacto de las comunidades microbianas intestinales en los individuos de ARG y de BRG.

Un pequeño número de especies bacterianas permite distinguir entre individuos de ARG y de BRG

Con el fin de someter a ensayo si podían distinguirse los individuos de BRG y ARG a partir de las especies bacterianas que alojan, los presentes inventores llevaron a cabo un análisis de características de receptor-operador (ROC). En primer lugar, estimaron la abundancia de 58 especies que eran significativamente diferentes en individuos de BRG y ARG (Tablas 4a y 4b). Para cada individuo, los presentes inventores utilizaron dichos valores para calcular una puntuación, denominada puntuación de abundancia bacteriana decisiva (ABD), igual a la suma de abundancias de las especies más frecuentes en los individuos de ARG menos la suma de las abundancias de las especies más frecuentes en los individuos de BRG. Se calcularon las puntuaciones de ABD exhaustivamente para todas las combinaciones de hasta 23 especies y se utilizaron en el análisis de ROC; los valores de área bajo la curva (AUC) para las mejores combinaciones se muestran en la figura 2. La mejor combinación de 4 especies proporcionó un valor de AUC de 0,98 (figura 2); en un ensayo de validación cruzada de diez veces con 90% de individuos seleccionados aleatoriamente, se obtuvo un valor de AUC de $0,976 \pm 0,02$ (s.d.) para los grupos del 10% restante, lo que muestra la robustez del análisis. Los presentes inventores concluyeron que los individuos de BRG y ARG pueden diferenciarse con precisión utilizando únicamente unas cuantas especies bacterianas.

Fenotipos de los individuos de ARG y de BRG

Las características de los materiales de estudio se proporcionan en la Tabla 10. Los presentes inventores

llevaron a cabo un fenotipado antropométrico y bioquímico de múltiples características interrelacionadas de los individuos de BRG y de ARG, e identificaron diferencias significativas entre ellos a una tasa de falso descubrimiento³⁴ de hasta 10% (Tabla 3). Se utilizó este valor para evitar la no detección de asociación significativas; en un diseño de estudio reciente comparable se seleccionó un nivel menos riguroso, de hasta 25%. Los individuos de BRG, que representaban el 23% de la población total de estudio, incluían una proporción significativamente más elevada de participantes obesos y como grupo se caracterizaban por una adiposidad más marcada, tal como refleja un incremento del porcentaje de masa grasa y de peso corporal (Tabla 3). El fenotipo de adiposidad de las personas de BRG se encontraba asociado a niveles séricos elevados de leptina, niveles séricos reducidos de adiponectina, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, niveles elevados de triglicéridos y ácidos grasos libres (AGL), nivel reducido de colesterol-HDL y un fenotipo inflamatorio más marcado (hsCRP incrementado y recuentos más elevados de glóbulos blancos) que los observados en individuos de ARG (Tabla 3). Los presentes inventores sometieron a ensayo adicionalmente la significancia de sus observaciones mediante el tratamiento de los recuentos génicos como variable continua y examinando sus correlaciones con las variables antropométricas y bioquímicas. La totalidad a excepción de dos (IMC y peso) de las diferencias observadas entre individuos de BRG y de ARG se observó que se encontraba significativamente asociadas a los recuentos génicos (Tabla 3). Conjuntamente estos análisis sugieren que los individuos de BRG están caracterizados por alteraciones metabólicas que es conocido que incrementan el riesgo de prediabetes, diabetes de tipo 2 y trastornos cardiovasculares isquémicos. Se encontraron anomalías similares en el artículo acompañante (Cotillard et al.).

Basándose en dichos resultados, los presentes inventores plantearon la hipótesis de que un desequilibrio entre especies bacterianas potencialmente proinflamatorias y antiinflamatorias desencadena una inflamación de grado bajo y resistencia a la insulina. En paralelo, sugieren que una flora intestinal alterada de los individuos de BRG induce el incremento indicado de niveles séricos de FIAF, induciendo una liberación elevada de triglicéridos y AGL (Tabla 3), tal como ponen de manifiesto los estudios en modelos de roedor.

Puede conseguirse una estratificación prácticamente perfecta de los individuos de BRG y ARG utilizando un número muy pequeño de especies bacterianas, lo que sugiere que pueden desarrollarse ensayos diagnósticos moleculares simples, basados en el otro genoma del ser humano, para identificar los individuos en riesgo de morbilidades comunes. Por lo tanto, la concentración en el otro genoma del ser humano, que en algunos aspectos aparentemente es más informativo que el propio genoma humano, podría impulsar el desarrollo de enfoques estratificados para el tratamiento y la prevención de trastornos crónicos extendidos.

Más allá de las disfunciones metabólicas, la inflamación de grado bajo observada en individuos de BRG con y sin obesidad se asocia a una multitud de otras enfermedades crónicas, las cuales se están incrementando constantemente (Bach, 2002). La posibilidad de que una baja riqueza bacteriana intestinal sea común a muchas o incluso a todas ellas, tal como ya se ha informado para la TII, podría revelarse mediante la exploración de la flora intestinal a un nivel metagenómico profundo en una amplia diversidad de estas enfermedades.

Tabla 3a. Características fenotípicas de 292 participantes en el estudio estratificados según recuentos génicos bajos y altos de *Bacteroides/Ruminococcus enterotypes*

	BRG	ARG	<i>p</i>	<i>q</i>	Recuentos génicos <i>p</i>	Recuentos génicos <i>q</i>
N (hombres/mujeres)	68 (23/45)	224 (113/111)			277 (133/144)	
Edad (años)	56 ± 7,5	57 ± 7,3	0,73	0,76	0,11	0,30
IMC (kg/m ²)	32 (29 - 34)	30 (23 - 33)	0,035	0,065	0,06	0,20
Peso (kg)	91 ± 21	87 ± 19	0,019	0,041	0,15	0,34
% de grasa	36 ± 7,8	31 ± 9,2	0,0069	0,024	0,0012	0,017
S- Insulina (pmoles/l)	50 (35 - 91)	44 (26 - 66)	0,0095	0,03	0,0052	0,04
HOMA-IR	1,9 (1,2 - 3,3)	1,6 (0,9 - 2,6)	0,012	0,033	0,0059	0,04
p-Triglicéridos (mmoles/l)	1,3 (0,97 - 1,8)	1,1 (0,82 - 1,6)	0,0014	0,013	0,0007	0,01
P-Ácidos grasos libres (mmoles/l)	0,55 (0,39 - 0,7)	0,48 (0,35 - 0,6)	0,014	0,033	0,0013	0,017
S-Leptina (μl)	17 (6,7 - 33)	8,3 (3,4 - 26)	0,0036	0,02	0,00057	0,010
S-Adiponectina (mg/l)	7,5 (5,5 - 13)	9,6 (6,7 - 14)	0,006	0,024	0,015	0,079
P-ALT (U/l)	20 (14 - 30)	19 (15 - 26)	0,22	0,22	0,029	0,12
B-leucocitos (10 ⁹ /l)	6,4 (5,2 - 7,8)	5,6 (4,8 - 6,9)	0,0019	0,013	0,0023	0,027
B-Linfocitos (10 ⁹ /l)	2,1	1,8	0,001	0,013	0,0044	0,0378

	BRG	ARG	<i>p</i>	<i>q</i>	Recuentos génicos <i>p</i>	Recuentos génicos <i>q</i>
	(1,6 - 2,3)	(1,5 - 2,1)				
P-CRP (mg/l)	2,3 (1,1 - 5,7)	1,4 (0,6 - 2,7)	0,00088	0,013	0,0033	0,033
S-FIAF (µg/l)	88 (72 - 120)	78 (60 - 100)	0,0047	0,022	0,011	0,061

Tabla 3b. Características fenotípicas de 292 participantes en el estudio estratificados según recuentos génicos bajos y altos de *Bacteroides/Ruminococcus enterotypes*

	<i>Bacteroides</i>	<i>Ruminococcus</i>	<i>p</i>	<i>q</i>
N (hombres/mujeres)	84 (37/47)	148 (64/84)		
Edad (años)	56 ± 7,2	57 ± 7,6	0,33	0,4
IMC (Kg/m ²)	31 (24 - 34)	30 (23 - 33)	0,18	0,3
Peso (kg)	90 ± 21	85 ± 19	0,032	0,1
% de grasa	34 ± 8,8	32 ± 9,2	0,058	0,16
S-Insulina (pmoles/l)	50 (36 - 75)	38 (23 - 64)	0,0019	0,016
HOMA-IR	1,8 (1,2 - 2,8)	1,4 (0,9 - 2,3)	0,0019	0,016
p-Triglicéridos (mmoles/l)	1,2 (0,92 - 1,6)	1,2 (0,83 - 1,6)	0,08	0,19
P-Ácidos grasos libres (mmoles/l)	0,51 (0,4 - 0,65)	0,48 (0,34 - 0,6)	0,022	0,088
S-Leptina (µl)	11,0 (5,7 - 30)	9,5 (3,4 - 28)	0,08	0,19
S-Adiponectina (mg/l)	8,0 (5,7 - 13)	9,9 (6,7 - 15)	0,1	0,2
P-ALT (U/l)	22 (14 - 31)	18 (15 - 24)	0,0028	0,016
B-leucocitos (10 ⁹ /l)	6,0 (4,9 - 7,4)	5,8 (4,9 - 7)	0,26	0,36
B-linfocitos (10 ⁹ /l)	2,0 (1,6 - 2,3)	1,7 (1,5 - 2)	0,0029	0,016
P-CRP (mg/l)	1,8 (0,8 - 3,7)	1,3 (0,67 - 2,6)	0,03	0,1
S-FIAF (µg/l)	85 (68 - 110)	76 (59 - 100)	0,098	0,2

5

Tabla 4a

id de agrupación	Número de genes	Prevalencia	Especie conocida	Genes de taxonomía conocida	Hit Chip Correlación (Spearman)	Filotipo (98% identidad de secuencia con 16S)
HL-1	14902	HGC			0,737	Bacteria no cultivada UC7-1
HL-2	5398	HGC			0,826	Bacteria no cultivada LD59
HL-3	3807	HGC			0,940	Bacteria no cultivada OLDB-C2
HL-4	3752	HGC			0,904	Bacteria no cultivada LN56
HL-5	3237	HGC			0,933	Bacteria no cultivada HuCA6
HL-6	2784	HGC			0,819	Bacteria no cultivada OLDB-H1
HL-7	2743	LGC				
HL-8	2443	HGC				
HL-9	2105	HGC			0,895	Bacteria no cultivada D726
HL-10	1921	HGC			0,734	Bacteria adhufec101
HL-11	1735	HGC				
HL-12	1732	HGC				
HL-13	1656	HGC			0,937	Bacteria no cultivada C747
HL-14	1642	HGC			0,932	Bacteria no cultivada C736
HL-15	1413	LGC				
HL-16	1216	HGC				
HL-17	1205	HGC			0,872	Bacteria no cultivada clon Eldhufec048
HL-18	1118	HGC				

id de agrupación	Número de genes	Prevalencia	Especie conocida	Genes de taxonomía conocida	Hit Chip Correlación (Spearman)	Filotipo (98% identidad de secuencia con 16S)
HL-19	1090	HGC			0,786	Bacteria adhufec269
HL-20	1023	LGC	<i>Ruminococcus gnavus</i>	963	0,815	<i>Ruminococcus gnavus</i>
HL-21	938	HGC				
HL-22	902	HGC				
HL-23	894	HGC				
HL-24	867	HGC				
HL-25	744	HGC	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	639		
HL-26	733	HGC				
HL-27	513	HGC				
HL-28	454	HGC				
HL-29	403	HGC			0,850	Bacteria no cultivada HuCB40
HL-30	370	HGC			0,888	Bacteria adhufec57
HL-31	366	HGC			0,905	Bacteria no cultivada OLDB-F4
HL-32	329	HGC			0,863	Bacteria no cultivada clon Eldhufec334
HL-33	324	HGC				
HL-34	322	HGC	<i>Coprococcus eutactus</i>	300	0,878	<i>Coprococcus eutactus</i>
HL-35	286	HGC				
HL-36	277	HGC				
HL-37	260	HGC				
HL-38	235	LGC	<i>Clostridium symbiosum</i>	233		
HL-39	234	LGC				
HL-40	230	HGC				
HL-41	214	HGC			0,804	Bacteria no cultivada OLDC-E8
HL-42	192	HGC			0,869	Bacteria no cultivada OLDB-E4
HL-43	191	HGC			0,711	Bacteria no cultivada adhufec30.25
HL-44	158	HGC			0,919	Bacteria no cultivada D692
HL-45	156	HGC				
HL-46	135	HGC				
HL-47	134	HGC			0,772	Bacteria no cultivada OLDB-A9
HL-48	126	HGC				
HL-49	125	LGC	<i>Clostridium clostridioforme</i>	109	0,816	<i>Clostridium clostridioforme</i>
HL-50	123	HGC				
HL-51	122	HGC				
HL-52	121	HGC				
HL-53	119	HGC				
HL-54	102	HGC			0,757	Bacteria no cultivada C352
HL-55	98	HGC				
HL-56	81	LGC	<i>Clostridium ramosum</i>	75		
HL-57	77	HGC			0,719	Bacteria no cultivada C352
HL-58	75	HGC			0,862	Bacteria no cultivada OLDA-H9

Tabla 4b

Id de agrupación	Grupo de tipo género (90% de identidad de secuencia con 16S)	Grupo de tipo orden	Filo	Mediana de p matrices metagenómicas
HL-1	<i>Sporobacter termitidis</i> et rel.	Agrupación Clostridium IV	Firmicutes	
HL-2	<i>Oscillospira guillermoidii</i> et rel.	Agrupación Clostridium IV	Firmicutes	
HL-3	Clostridiales no cultivadas II	Clostridiales no cultivadas	Firmicutes	
HL-4	<i>Anaerovorax odorimutans</i> et rel.	Clostridium cluster XI	Firmicutes	
HL-5	Clostridiales II no cultivadas	Clostridiales no cultivadas	Firmicutes	
HL-6	Clostridiales II no cultivadas	Clostridiales no cultivadas	Firmicutes	
HL-7				2,5E-10
HL-8				
HL-9	<i>Butyrivibrio crossotus</i> et rel.	Agrupación Clostridium XIVa	Firmicutes	
HL-10	<i>Anaerotruncus colihominis</i> et rel.	Agrupación Clostridium IV	Firmicutes	
HL-11				
HL-12				
HL-13	<i>Sporobacter termitidis</i> et rel.	Agrupación Clostridium IV	Firmicutes	
HL-14	Clostridiales no cultivadas II	Clostridiales no cultivadas	Firmicutes	
HL-15				7,8E-06
HL-16				
HL-17	<i>Bacteroides splanchnicus</i> et rel.	Bacteroidetes	Bacteroidetes	
HL-18				
HL-19	<i>Oscillospira guillermoidii</i> et rel.	Agrupación Clostridium IV	Firmicutes	
HL-20	<i>Ruminococcus gnavus</i> et rel.	Agrupación Clostridium XIVa	Firmicutes	4,0E-08
HL-21				
HL-22				
HL-23				
HL-24				
HL-25				8,9E-03
HL-26				
HL-27				
HL-28				
HL-29	<i>Butyrivibrio crossotus</i> et rel.	Agrupación Clostridium XIVa	Firmicutes	
HL-30	<i>Coprococcus eutactus</i> et rel.	Agrupación Clostridium XIVa	Firmicutes	
HL-31	Clostridiales no cultivadas II	Clostridiales no cultivadas	Firmicutes	
HL-32	Clostridiales no cultivadas II	Clostridiales no cultivadas	Firmicutes	
HL-33				
HL-34	<i>Coprococcus eutactus</i> et rel.	Agrupación Clostridium XIVa	Firmicutes	
HL-35				
HL-36				
HL-37				
HL-38				
HL-39				8,5E-05
HL-40				
HL-41	<i>Sporobacter termitidis</i> et rel.	Agrupación	Firmicutes	

Id de agrupación	Grupo de tipo género (90% de identidad de secuencia con 16S)	Grupo de tipo orden	Filo	Mediana de p matrices metagenómicas
		Clostridium IV		
HL-42	Clostridium cellulosi et rel.	Agrupación Clostridium IV	Firmicutes	
HL-43	Ruminococcus obeum et rel.	Agrupación Clostridium XIVa	Firmicutes	
HL-44	Butyrivibrio crossotus et rel.	Agrupación Clostridium XIVa	Firmicutes	
HL-45				
HL-46				
HL-47	Clostridiales no cultivadas I	Clostridiales no cultivadas	Firmicutes	
HL-48				
HL-49	Clostridium symbiosum et rel.	Agrupación Clostridium XIVa	Firmicutes	1,5E-10
HL-50				
HL-51				
HL-52				
HL-53				1,4E-03
HL-54	Sporobacter termitidis et rel.	Agrupación Clostridium IV	Firmicutes	
HL-55				
HL-56				
HL-57	Sporobacter termitidis et rel.	Agrupación Clostridium IV	Firmicutes	
HL-58	Clostridiales no cultivadas I	Clostridiales no cultivadas	Firmicutes	

Tabla 5

	Bajo recuento génico	Alto recuento génico			Recuento génico	
			p	q	p	q
N	64 (22/42)	224 (113/111)			277 (133/144)	
Edad (años)	56 (50 - 62)	57 (50 - 61)	0,9	0,9	0,81	0,84
IMC (kg/m ²)	32 (28 - 34)	30 (23 - 33)	0,092	0,14	0,11	0,18
Peso (kg)	95 (75 - 100)	86 (71 - 100)	0,046	0,079	0,12	0,18
Porcentaje de grasa corporal total (%)	35 (29 - 42)	31 (25 - 39)	0,017	0,057	0,0024	0,014
Proporción cintura/cadera	0,90 (0,85 - 0,96)	0,90 (0,84 - 0,97)	0,089	0,14	0,044	0,079
Diámetro sagital (cm)	24 (20 - 25)	22 (18 - 26)	0,4	0,47	0,21	0,26
IAAT (cm ²)	150 (110 - 170)	150 (93 - 180)	0,43	0,48	0,19	0,24
P-Glucosa (mmoles/l)	5,8 (5,4 - 6,2)	5,7 (5,4 - 6,1)	0,3	0,39	0,19	0,24
HbA1c (%)	5,5 (5,3 - 5,7)	5,6 (5,3 - 5,7)	0,84	0,9	0,88	0,88
S-Insulina (pmoles/l)	47 (34 - 84)	44 (26 - 66)	0,041	0,079	0,0052	0,018
HOMA-IR	1,8 (1,2 - 3,0)	1,6 (0,9 - 2,6)	0,044	0,079	0,0059	0,018
P-Colesterol (mmoles/l)	5,5 (4,8 - 6,1)	5,4 (4,8 - 6,1)	0,87	0,9	0,79	0,81
P-Colesterol-HDL (mmoles/l)	1,3 (1,1 - 1,7)	1,5 (1,2 - 1,8)	0,047	0,079	0,24	0,28
P-Triglicéridos (mmoles/l)	1,3 (1,0 - 1,8)	1,1 (0,8 - 1,6)	0,0028	0,036	0,00073	0,0062
P-Ácidos grasos libres (mmoles/l)	0,52 (0,39 - 0,69)	0,48 (0,35 - 0,60)	0,026	0,064	0,00042	0,0062
P-ALT (U/l)	20(14-31)	19 (15 - 26)	0,15	0,2	0,029	0,06
S-Leptina (μl)	15,0 (6,7 - 32,0)	8,3 (3,4 - 26,0)	0,0071	0,036	0,00058	0,0062
S-Adiponectina (mg/l)	7,6 (5,6 - 13,0)	9,6 (6,7 - 14,0)	0,032	0,072	0,016	0,036
B-Leucocitos (10 ⁹ /l)	6,4 (5,2 - 7,8)	5,6 (4,8 - 6,9)	0,0053	0,036	0,0026	0,014
B-Linfocitos (10 ⁹ /l)	2,1 (1,6 - 2,3)	1,8 (1,5 - 2,1)	0,0014	0,036	0,0037	0,015
B-Neutrófilos (10 ⁹ /l)	3,7 (2,8 - 4,8)	3,1 (2,5 - 4,1)	0,019	0,057	0,0092	0,023
B-Monocitos (10 ⁹ /l)	0,5 (0,4 - 0,6)	0,4 (0,4 - 0,6)	0,0081	0,036	0,12	0,18
P-CRP (mg/l)	1,9 (1,0 - 5,4)	1,4 (0,6 - 2,7)	0,0041	0,036	0,0038	0,015
S-IL-6 (ng/l)	17,0 (11,0 - 31,0)	13,0 (6,3 - 24,0)	0,023	0,062	0,044	0,079
S-TNFalfa (ng/l)	13,0 (0,04 - 54,0)	8,6 (0,04 - 32,0)	0,13	0,18	0,46	0,52

	Bajo recuento génico	Alto recuento génico			Recuento génico	
S-FIAF (µg/l)	87 (72 - 120)	78 (60 - 100)	0,012	0,046	0,0088	0,023
S-LBP (µg/l)	19 (15 - 25)	19 (15 - 23)	0,4	0,47	0,16	0,23

Tabla 6: AUC obtenidos determinando la presencia o ausencia de la totalidad de los 50 genes de una especie bacteriana dada.

Especie bacteriana	AUC	Especie bacteriana	AUC
HL-1	0,936055672268908	HL-55	0,789653361344538
HL-57	0,904083508403361	HL-50	0,787847951680672
HL-53	0,895680147058824	HL-58	0,785057773109244
HL-4	0,895647321428571	HL-34	0,784729516806723
HL-54	0,894826680672269	HL-25	0,778886554621849
HL-2	0,889705882352941	HL-6	0,775013130252101
HL-3	0,883009453781513	HL-51	0,7734375
HL-8	0,8828125	HL-19	0,765887605042017
HL-10	0,877002363445378	HL-27	0,76437762605042
HL-45	0,876838235294118	HL-36	0,761357668067227
HL-22	0,876050420168067	HL-52	0,756171218487395
HL-26	0,875525210084034	HL-48	0,754759716386555
HL-9	0,872242647058823	HL-29	0,75108324579832
HL-5	0,866530987394958	HL-24	0,749015231092437
HL-11	0,858357405462185	HL-47	0,745765493697479
HL-14	0,857110031512605	HL-42	0,745338760504202
HL-13	0,849954044117647	HL-43	0,743106617647059
HL-18	0,847098214285714	HL-15	0,742450105042017
HL-12	0,846474527310924	HL-49	0,742089023109244
HL-21	0,836594012605042	HL-35	0,741530987394958
HL-41	0,825728728991597	HL-30	0,736935399159664
HL-32	0,81906512605042	HL-40	0,72780987394958
HL-17	0,816307773109244	HL-28	0,726529674369748
HL-44	0,815027573529412	HL-23	0,723608193277311
HL-20	0,814732142857143	HL-56	0,723542542016807
HL-46	0,811548056722689	HL-7	0,711758140756303
HL-31	0,806492909663866	HL-33	0,707851890756303
HL-16	0,799041491596639	HL-39	0,702271533613445
HL-37	0,794708508403361	HL-38	0,690388655462185

5

Tabla 7: AUC obtenidos superiores a 0,9 al determinar la diversidad intestinal baja mediante la detección de la presencia o ausencia de 50 genes bacterianos de la combinación dada de 2 especies bacterianas.

Combinación de especies bacterianas	AUC	Combinación de especies bacterianas	AUC
HL-1 y HL-5	0,955685399159664	HL-10 y HL-32	0,91281512605042
HL-1 y HL-10	0,953551733193277	HL-12 y HL-13	0,912749474789916
HL-1 y HL-3	0,949973739495798	HL-13 y HL-22	0,912683823529412
HL-1 y HL-8	0,946625525210084	HL-8 y HL-25	0,912618172268908
HL-1 y HL-28	0,945542279411765	HL-5 y HL-54	0,912552521008403
HL-1 y HL-47	0,945214023109244	HL-4 y HL-7	0,9124868697479
HL-8 y HL-26	0,943014705882353	HL-31 y HL-57	0,912486869747899
HL-1 y HL-13	0,942883403361345	HL-4 y HL-15	0,912421218487395
HL-5 y HL-57	0,942883403361344	HL-18 y HL-21	0,912421218487395
HL-1 y HL-22	0,942620798319328	HL-34 y HL-54	0,912421218487395
HL-1 y HL-35	0,942587972689076	HL-25 y HL-45	0,912289915966386
HL-1 y HL-26	0,94202993697479	HL-2 y HL-53	0,912257090336134
HL-1 y HL-25	0,941832983193278	HL-10 y HL-35	0,912092962184874
HL-1 y HL-33	0,941307773109244	HL-10 y HL-49	0,912092962184874
HL-3 y HL-53	0,940848214285714	HL-18 y HL-57	0,912092962184874
HL-1 y HL-12	0,940716911764706	HL-44 y HL-57	0,912092962184874
HL-1 y HL-27	0,940651260504202	HL-26 y HL-45	0,911961659663866
HL-10 y HL-53	0,940651260504202	HL-37 y HL-57	0,911961659663866

ES 2 683 826 T3

Combinación de especies bacterianas	AUC	Combinación de especies bacterianas	AUC
HL-1 y HL-4	0,940388655462185	HL-11 y HL-14	0,911928834033613
HL-1 y HL-18	0,940290178571429	HL-2 y HL-22	0,911896008403361
HL-1 y HL-23	0,940290178571429	HL-12 y HL-21	0,911863182773109
HL-10 y HL-11	0,939863445378151	HL-31 y HL-53	0,911830357142857
HL-4 y HL-26	0,939764968487395	HL-10 y HL-25	0,911699054621849
HL-26 y HL-53	0,939239758403361	HL-3 y HL-27	0,911633403361345
HL-1 y HL-37	0,939141281512605	HL-4 y HL-46	0,911633403361344
HL-1 y HL-51	0,939108455882353	HL-8 y HL-27	0,911633403361344
HL-1 y HL-53	0,938813025210084	HL-40 y HL-57	0,911633403361344
HL-8 y HL-53	0,938025210084034	HL-11 y HL-13	0,911502100840336
HL-1 y HL-31	0,93795955882353	HL-13 y HL-57	0,911436449579832
HL-10 y HL-21	0,937959558823529	HL-27 y HL-57	0,911370798319328
HL-1 y HL-21	0,937204569327731	HL-49 y HL-57	0,911305147058824
HL-3 y HL-26	0,937138918067227	HL-2 y HL-47	0,911305147058823
HL-1 y HL-46	0,93671218487395	HL-5 y HL-44	0,911305147058823
HL-1 y HL-32	0,936383928571429	HL-10 y HL-56	0,911272321428572
HL-13 y HL-53	0,936351102941176	HL-2 y HL-46	0,911272321428571
HL-8 y HL-11	0,935924369747899	HL-21 y HL-32	0,911239495798319
HL-8 y HL-21	0,935497636554622	HL-2 y HL-8	0,911173844537815
HL-5 y HL-11	0,93546481092437	HL-12 y HL-22	0,911173844537815
HL-1 y HL-40	0,935202205882353	HL-46 y HL-53	0,911173844537815
HL-3 y HL-4	0,934939600840336	HL-7 y HL-53	0,911108193277311
HL-1 y HL-11	0,934808298319328	HL-26 y HL-51	0,911108193277311
HL-1 y HL-9	0,934414390756303	HL-22 y HL-25	0,911042542016807
HL-22 y HL-26	0,933626575630252	HL-38 y HL-57	0,910911239495799
HL-8 y HL-45	0,933560924369748	HL-23 y HL-57	0,910911239495798
HL-8 y HL-9	0,933035714285714	HL-8 y HL-44	0,910878413865546
HL-3 y HL-5	0,932707457983193	HL-1 y HL-20	0,910845588235294
HL-5 y HL-13	0,932280724789916	HL-33 y HL-57	0,91077993697479
HL-10 y HL-22	0,93218224789916	HL-4 y HL-28	0,910484506302521
HL-3 y HL-8	0,932116596638656	HL-10 y HL-15	0,910386029411764
HL-4 y HL-8	0,931755514705882	HL-13 y HL-37	0,910254726890756
HL-13 y HL-26	0,931427258403361	HL-32 y HL-53	0,910254726890756
HL-4 y HL-10	0,931263130252101	HL-2 y HL-17	0,910189075630252
HL-5 y HL-45	0,931131827731092	HL-3 y HL-15	0,91015625
HL-1 y HL-36	0,931066176470588	HL-35 y HL-57	0,910123424369748
HL-3 y HL-18	0,930015756302521	HL-11 y HL-18	0,909959296218487
HL-4 y HL-5	0,930015756302521	HL-26 y HL-37	0,909959296218487
HL-2 y HL-5	0,929982930672269	HL-13 y HL-49	0,909860819327731
HL-1 y HL-49	0,92985162815126	HL-15 y HL-53	0,909860819327731
HL-1 y HL-45	0,929785976890757	HL-4 y HL-9	0,909762342436975
HL-1 y HL-14	0,929359243697479	HL-25 y HL-57	0,909663865546218
HL-1 y HL-2	0,929326418067227	HL-29 y HL-54	0,909663865546218
HL-1 y HL-15	0,929326418067227	HL-3 y HL-36	0,909466911764706
HL-5 y HL-17	0,929096638655462	HL-22 y HL-57	0,909466911764706
HL-8 y HL-18	0,929096638655462	HL-2 y HL-31	0,909401260504202
HL-3 y HL-10	0,929030987394958	HL-2 y HL-21	0,909269957983193
HL-21 y HL-53	0,92889968487395	HL-8 y HL-36	0,908974527310924
HL-3 y HL-11	0,928768382352941	HL-5 y HL-46	0,908941701680672
HL-10 y HL-45	0,928669905462185	HL-16 y HL-57	0,908941701680672
HL-1 y HL-57	0,927980567226891	HL-35 y HL-45	0,908876050420168
HL-10 y HL-57	0,927980567226891	HL-1 y HL-48	0,908843224789916
HL-10 y HL-18	0,927947741596639	HL-12 y HL-18	0,908810399159664
HL-25 y HL-53	0,927914915966387	HL-8 y HL-49	0,908613445378151
HL-4 y HL-21	0,927849264705882	HL-36 y HL-57	0,908613445378151
HL-8 y HL-13	0,927849264705882	HL-45 y HL-47	0,908580619747899
HL-3 y HL-45	0,927422531512605	HL-5 y HL-41	0,908547794117647
HL-1 y HL-17	0,927127100840336	HL-9 y HL-26	0,908547794117647
HL-10 y HL-17	0,927061449579832	HL-2 y HL-57	0,908482142857143
HL-4 y HL-11	0,927061449579831	HL-10 y HL-27	0,908416491596639

Combinación de especies bacterianas	AUC	Combinación de especies bacterianas	AUC
HL-5 y HL-26	0,92702862394958	HL-51 y HL-53	0,908416491596639
HL-4 y HL-53	0,925814075630252	HL-4 y HL-49	0,908416491596638
HL-18 y HL-53	0,925551470588235	HL-51 y HL-57	0,908416491596638
HL-10 y HL-13	0,925518644957983	HL-8 y HL-32	0,908383665966387
HL-1 y HL-56	0,925485819327731	HL-3 y HL-25	0,908350840336134
HL-3 y HL-21	0,925420168067227	HL-12 y HL-45	0,908350840336134
HL-1 y HL-16	0,925190388655463	HL-9 y HL-53	0,908318014705882
HL-3 y HL-22	0,92515756302521	HL-28 y HL-53	0,90828518907563
HL-4 y HL-13	0,924960609243697	HL-14 y HL-57	0,908219537815126
HL-5 y HL-21	0,924960609243697	HL-8 y HL-15	0,908088235294118
HL-1 y HL-7	0,924796481092437	HL-9 y HL-13	0,907924107142857
HL-4 y HL-22	0,924730829831933	HL-7 y HL-8	0,907891281512605
HL-5 y HL-10	0,924698004201681	HL-26 y HL-31	0,907825630252101
HL-10 y HL-46	0,924665178571429	HL-21 y HL-27	0,907694327731092
HL-4 y HL-14	0,924501050420168	HL-21 y HL-37	0,907694327731092
HL-5 y HL-25	0,924435399159664	HL-22 y HL-47	0,907694327731092
HL-35 y HL-53	0,924402573529412	HL-23 y HL-53	0,907628676470588
HL-8 y HL-22	0,924238445378151	HL-2 y HL-9	0,907563025210084
HL-12 y HL-26	0,924041491596639	HL-8 y HL-31	0,907563025210084
HL-5 y HL-14	0,924008665966386	HL-14 y HL-22	0,907563025210084
HL-3 y HL-17	0,923713235294118	HL-5 y HL-47	0,90749737394958
HL-9 y HL-10	0,923384978991596	HL-9 y HL-14	0,90749737394958
HL-22 y HL-53	0,923319327731092	HL-8 y HL-37	0,907431722689076
HL-18 y HL-26	0,923253676470588	HL-32 y HL-57	0,907431722689075
HL-11 y HL-57	0,922859768907563	HL-21 y HL-45	0,907300420168067
HL-1 y HL-44	0,922794117647059	HL-27 y HL-45	0,906906512605042
HL-5 y HL-22	0,922728466386554	HL-4 y HL-12	0,906808035714286
HL-1 y HL-38	0,92266281512605	HL-3 y HL-44	0,906775210084034
HL-10 y HL-26	0,922465861344538	HL-4 y HL-20	0,906709558823529
HL-4 y HL-25	0,922137605042017	HL-15 y HL-57	0,906709558823529
HL-2 y HL-3	0,921973476890756	HL-14 y HL-32	0,906578256302521
HL-5 y HL-8	0,921842174369748	HL-11 y HL-27	0,906545430672269
HL-4 y HL-35	0,921678046218487	HL-28 y HL-45	0,906446953781513
HL-5 y HL-9	0,921448266806723	HL-2 y HL-25	0,906315651260504
HL-4 y HL-27	0,921382615546219	HL-2 y HL-27	0,90625
HL-4 y HL-45	0,921382615546218	HL-4 y HL-17	0,90625
HL-8 y HL-10	0,921382615546218	HL-13 y HL-56	0,905921743697479
HL-5 y HL-53	0,92062762605042	HL-10 y HL-47	0,905856092436975
HL-4 y HL-47	0,920594800420168	HL-41 y HL-57	0,905856092436975
HL-8 y HL-17	0,920594800420168	HL-11 y HL-45	0,90579044117647
HL-18 y HL-22	0,920529149159664	HL-2 y HL-4	0,905593487394958
HL-8 y HL-57	0,920430672268908	HL-10 y HL-31	0,905593487394958
HL-9 y HL-57	0,920299369747899	HL-4 y HL-23	0,905560661764706
HL-22 y HL-35	0,920299369747899	HL-9 y HL-45	0,905527836134454
HL-8 y HL-47	0,920102415966387	HL-46 y HL-57	0,905462184873949
HL-8 y HL-20	0,92000393907563	HL-4 y HL-51	0,905396533613446
HL-21 y HL-26	0,919971113445378	HL-13 y HL-46	0,905265231092437
HL-3 y HL-9	0,919774159663865	HL-2 y HL-35	0,905199579831933
HL-8 y HL-35	0,919511554621849	HL-14 y HL-45	0,905166754201681
HL-14 y HL-26	0,91938025210084	HL-18 y HL-32	0,905035451680672
HL-26 y HL-35	0,919248949579832	HL-9 y HL-18	0,904969800420168
HL-4 y HL-18	0,919051995798319	HL-11 y HL-26	0,904936974789916
HL-11 y HL-53	0,919051995798319	HL-2 y HL-12	0,904805672268908
HL-37 y HL-53	0,919019170168067	HL-4 y HL-56	0,904805672268908
HL-1 y HL-39	0,918887867647059	HL-22 y HL-51	0,904674369747899
HL-1 y HL-6	0,918855042016807	HL-11 y HL-12	0,904477415966386
HL-5 y HL-35	0,91875656512605	HL-13 y HL-31	0,904411764705882
HL-17 y HL-57	0,918723739495799	HL-18 y HL-25	0,904411764705882
HL-3 y HL-20	0,918658088235294	HL-1 y HL-42	0,904313287815127
HL-26 y HL-27	0,918625262605042	HL-2 y HL-33	0,904017857142857

ES 2 683 826 T3

Combinación de especies bacterianas	AUC	Combinación de especies bacterianas	AUC
HL-47 y HL-53	0,918526785714286	HL-2 y HL-51	0,903952205882353
HL-25 y HL-26	0,918461134453782	HL-13 y HL-32	0,903952205882353
HL-3 y HL-32	0,918264180672269	HL-8 y HL-33	0,903886554621849
HL-14 y HL-53	0,917870273109244	HL-33 y HL-45	0,903820903361345
HL-12 y HL-53	0,917837447478991	HL-2 y HL-14	0,903820903361344
HL-8 y HL-46	0,917804621848739	HL-8 y HL-28	0,903623949579832
HL-53 y HL-57	0,917607668067227	HL-10 y HL-37	0,90359112394958
HL-4 y HL-31	0,917279411764706	HL-9 y HL-27	0,903394170168067
HL-27 y HL-53	0,917246586134454	HL-1 y HL-50	0,903361344537816
HL-3 y HL-56	0,917148109243697	HL-5 y HL-37	0,903230042016807
HL-33 y HL-53	0,917082457983193	HL-54 y HL-55	0,903230042016807
HL-2 y HL-45	0,916819852941176	HL-11 y HL-22	0,903098739495798
HL-3 y HL-57	0,916819852941176	HL-20 y HL-53	0,902836134453781
HL-21 y HL-22	0,916622899159664	HL-49 y HL-53	0,902540703781513
HL-1 y HL-52	0,916491596638656	HL-56 y HL-57	0,90250787815126
HL-2 y HL-11	0,916491596638655	HL-8 y HL-16	0,902048319327731
HL-5 y HL-18	0,916491596638655	HL-22 y HL-27	0,902048319327731
HL-13 y HL-18	0,916261817226891	HL-54 y HL-57	0,902048319327731
HL-4 y HL-33	0,916130514705882	HL-7 y HL-21	0,902015493697479
HL-2 y HL-13	0,915966386554622	HL-21 y HL-31	0,901917016806723
HL-5 y HL-12	0,915966386554622	HL-10 y HL-54	0,901785714285715
HL-5 y HL-20	0,915966386554622	HL-22 y HL-49	0,901785714285714
HL-26 y HL-47	0,915900735294118	HL-2 y HL-56	0,90172006302521
HL-3 y HL-37	0,915703781512605	HL-10 y HL-44	0,90172006302521
HL-26 y HL-32	0,915703781512605	HL-23 y HL-45	0,901588760504202
HL-4 y HL-57	0,915572478991596	HL-3 y HL-7	0,901457457983194
HL-3 y HL-13	0,915506827731092	HL-22 y HL-23	0,901457457983193
HL-8 y HL-56	0,915506827731092	HL-13 y HL-15	0,901391806722689
HL-45 y HL-57	0,915441176470588	HL-4 y HL-40	0,901358981092437
HL-45 y HL-53	0,91530987394958	HL-5 y HL-36	0,901326155462185
HL-10 y HL-14	0,915112920168067	HL-4 y HL-38	0,901227678571428
HL-18 y HL-45	0,915112920168067	HL-2 y HL-37	0,901194852941176
HL-26 y HL-57	0,915047268907563	HL-48 y HL-54	0,901129201680672
HL-2 y HL-10	0,914915966386555	HL-53 y HL-56	0,900997899159664
HL-2 y HL-18	0,914915966386555	HL-3 y HL-16	0,900965073529412
HL-3 y HL-46	0,914522058823529	HL-4 y HL-16	0,90093224789916
HL-2 y HL-26	0,914390756302521	HL-8 y HL-39	0,90093224789916
HL-13 y HL-21	0,914325105042017	HL-9 y HL-25	0,900768119747899
HL-8 y HL-14	0,914292279411765	HL-2 y HL-32	0,90063681722689
HL-3 y HL-31	0,914259453781513	HL-20 y HL-57	0,900603991596638
HL-4 y HL-32	0,9140625	HL-21 y HL-35	0,900571165966387
HL-47 y HL-57	0,913996848739496	HL-48 y HL-57	0,900538340336134
HL-1 y HL-41	0,913931197478992	HL-10 y HL-41	0,900505514705882
HL-8 y HL-12	0,913799894957983	HL-3 y HL-14	0,90047268907563
HL-4 y HL-37	0,913635766806723	HL-42 y HL-54	0,90047268907563
HL-13 y HL-45	0,91343881302521	HL-47 y HL-54	0,900407037815126
HL-28 y HL-57	0,91327468487395	HL-5 y HL-42	0,900341386554622
HL-21 y HL-57	0,913209033613445	HL-50 y HL-57	0,900341386554622
HL-3 y HL-12	0,913044905462185	HL-7 y HL-54	0,900275735294118
HL-39 y HL-57	0,913012079831933	HL-13 y HL-20	0,900275735294118
HL-10 y HL-12	0,912946428571429	HL-5 y HL-32	0,900210084033613
HL-10 y HL-20	0,912946428571429	HL-3 y HL-35	0,900177258403361
HL-12 y HL-57	0,912946428571428	HL-7 y HL-10	0,90014443277311
HL-11 y HL-37	0,912880777310924	HL-2 y HL-41	0,900144432773109
HL-3 y HL-49	0,912847951680672	HL-52 y HL-54	0,900013130252101
HL-7 y HL-57	0,91281512605042		

Tabla 8: AUC obtenidos superiores a 0,95 al determinar una baja diversidad intestinal mediante la detección de la presencia o ausencia de 50 genes bacterianos de la combinación dada de 3 especies bacterianas.

Combinación de especies bacterianas	AUC	Combinación de especies bacterianas	AUC
HL-8 y HL-26 y HL-53	0,966123949579832	HL-1 y HL-3 y HL-13	0,953321953781513
HL-1 y HL-5 y HL-10	0,964778098739496	HL-1 y HL-5 y HL-14	0,953256302521009
HL-8 y HL-13 y HL-26	0,96297268907563	HL-4 y HL-5 y HL-17	0,953157825630253
HL-3 y HL-8 y HL-26	0,962841386554622	HL-4 y HL-10 y HL-26	0,953125
HL-1 y HL-3 y HL-5	0,962349002100841	HL-10 y HL-21 y HL-27	0,953125
HL-1 y HL-5 y HL-28	0,961790966386555	HL-3 y HL-10 y HL-11	0,953059348739495
HL-1 y HL-5 y HL-17	0,960740546218487	HL-8 y HL-11 y HL-26	0,952993697478992
HL-1 y HL-5 y HL-35	0,960707720588236	HL-3 y HL-21 y HL-53	0,952960871848739
HL-1 y HL-5 y HL-47	0,960707720588236	HL-1 y HL-3 y HL-33	0,952928046218487
HL-1 y HL-5 y HL-8	0,96031381302521	HL-1 y HL-3 y HL-23	0,952895220588235
HL-1 y HL-4 y HL-5	0,959887079831933	HL-1 y HL-28 y HL-47	0,952862394957984
HL-3 y HL-26 y HL-53	0,959722951680672	HL-4 y HL-5 y HL-11	0,952862394957983
HL-1 y HL-3 y HL-10	0,959591649159664	HL-10 y HL-35 y HL-53	0,952862394957983
HL-1 y HL-5 y HL-11	0,959361869747899	HL-1 y HL-8 y HL-47	0,952796743697479
HL-1 y HL-5 y HL-25	0,959132090336135	HL-10 y HL-13 y HL-26	0,952796743697479
HL-1 y HL-5 y HL-33	0,959099264705883	HL-8 y HL-25 y HL-26	0,952731092436975
HL-1 y HL-5 y HL-26	0,958967962184874	HL-8 y HL-26 y HL-45	0,952731092436975
HL-4 y HL-8 y HL-26	0,958967962184874	HL-1 y HL-3 y HL-25	0,952698266806723
HL-8 y HL-21 y HL-53	0,95890231092437	HL-1 y HL-8 y HL-28	0,952665441176471
HL-10 y HL-21 y HL-53	0,95890231092437	HL-1 y HL-10 y HL-36	0,952665441176471
HL-1 y HL-5 y HL-22	0,958869485294118	HL-10 y HL-11 y HL-53	0,95266544117647
HL-1 y HL-8 y HL-10	0,958869485294118	HL-1 y HL-3 y HL-27	0,952566964285715
HL-5 y HL-10 y HL-17	0,958803834033613	HL-7 y HL-10 y HL-21	0,952534138655463
HL-1 y HL-5 y HL-12	0,95873818277311	HL-3 y HL-5 y HL-10	0,952534138655462
HL-1 y HL-5 y HL-13	0,958377100840337	HL-13 y HL-35 y HL-53	0,952402836134454
HL-1 y HL-5 y HL-27	0,958377100840337	HL-10 y HL-27 y HL-53	0,952370010504202
HL-1 y HL-10 y HL-28	0,95811449579832	HL-3 y HL-13 y HL-53	0,95233718487395
HL-1 y HL-10 y HL-47	0,958048844537815	HL-10 y HL-11 y HL-37	0,952337184873949
HL-8 y HL-10 y HL-11	0,957983193277311	HL-10 y HL-13 y HL-21	0,952304359243697
HL-8 y HL-21 y HL-26	0,957753413865546	HL-7 y HL-8 y HL-21	0,952140231092437
HL-8 y HL-26 y HL-47	0,95765493697479	HL-3 y HL-8 y HL-45	0,952074579831933
HL-1 y HL-5 y HL-32	0,957589285714286	HL-10 y HL-11 y HL-26	0,952074579831933
HL-1 y HL-5 y HL-9	0,957523634453781	HL-1 y HL-8 y HL-26	0,951943277310924
HL-8 y HL-13 y HL-53	0,957523634453781	HL-5 y HL-11 y HL-26	0,951943277310924
HL-1 y HL-10 y HL-22	0,957425157563025	HL-1 y HL-8 y HL-35	0,951844800420168
HL-13 y HL-26 y HL-53	0,957359506302521	HL-10 y HL-11 y HL-13	0,951811974789916
HL-1 y HL-5 y HL-53	0,957326680672269	HL-5 y HL-8 y HL-26	0,951779149159664
HL-1 y HL-5 y HL-23	0,957293855042017	HL-5 y HL-10 y HL-13	0,951779149159664
HL-8 y HL-12 y HL-26	0,957293855042017	HL-1 y HL-3 y HL-4	0,951680672268907
HL-3 y HL-8 y HL-11	0,957261029411765	HL-1 y HL-5 y HL-39	0,951647846638656
HL-1 y HL-10 y HL-35	0,957195378151261	HL-1 y HL-3 y HL-12	0,951615021008404
HL-3 y HL-8 y HL-53	0,956998424369748	HL-1 y HL-3 y HL-37	0,951615021008403
HL-3 y HL-10 y HL-53	0,956998424369748	HL-1 y HL-10 y HL-11	0,951615021008403
HL-1 y HL-5 y HL-21	0,956965598739496	HL-1 y HL-3 y HL-51	0,951582195378151
HL-1 y HL-10 y HL-13	0,956932773109244	HL-1 y HL-3 y HL-53	0,951582195378151
HL-1 y HL-10 y HL-27	0,956899947478992	HL-1 y HL-5 y HL-7	0,951549369747899
HL-5 y HL-8 y HL-11	0,95686712184874	HL-10 y HL-11 y HL-27	0,951549369747899
HL-5 y HL-8 y HL-17	0,956801470588235	HL-1 y HL-10 y HL-46	0,951516544117647
HL-8 y HL-26 y HL-3 5	0,956801470588235	HL-1 y HL-13 y HL-47	0,951450892857143
HL-1 y HL-5 y HL-51	0,956702993697479	HL-1 y HL-8 y HL-13	0,951418067226891
HL-1 y HL-5 y HL-36	0,956670168067227	HL-1 y HL-5 y HL-6	0,951352415966387
HL-1 y HL-5 y HL-37	0,956538865546219	HL-1 y HL-8 y HL-22	0,951221113445378
HL-1 y HL-4 y HL-10	0,956473214285714	HL-4 y HL-13 y HL-26	0,951221113445378
HL-1 y HL-3 y HL-8	0,956309086134454	HL-5 y HL-13 y HL-17	0,951221113445378
HL-1 y HL-5 y HL-40	0,956276260504202	HL-10 y HL-11 y HL-22	0,951221113445378
HL-10 y HL-21 y HL-26	0,956210609243697	HL-1 y HL-22 y HL-47	0,951188287815126
HL-1 y HL-10 y HL-12	0,956177783613446	HL-1 y HL-3 y HL-18	0,951155462184874
HL-8 y HL-26 y HL-27	0,956079306722689	HL-8 y HL-26 y HL-32	0,951155462184874

Combinación de especies bacterianas	AUC	Combinación de especies bacterianas	AUC
HL-1 y HL-10 y HL-26	0,955980829831933	HL-1 y HL-8 y HL-33	0,95108981092437
HL-5 y HL-10 y HL-11	0,955882352941176	HL-5 y HL-8 y HL-13	0,951024159663865
HL-1 y HL-10 y HL-23	0,955816701680672	HL-5 y HL-13 y HL-26	0,950958508403361
HL-3 y HL-5 y HL-17	0,955816701680672	HL-4 y HL-26 y HL-53	0,950892857142857
HL-8 y HL-18 y HL-26	0,95578387605042	HL-8 y HL-26 y HL-31	0,950892857142857
HL-3 y HL-18 y HL-26	0,955751050420168	HL-8 y HL-27 y HL-53	0,950892857142857
HL-1 y HL-5 y HL-45	0,955718224789917	HL-22 y HL-26 y HL-47	0,950892857142857
HL-8 y HL-10 y HL-53	0,955685399159664	HL-1 y HL-5 y HL-16	0,950860031512605
HL-10 y HL-13 y HL-53	0,955652573529412	HL-1 y HL-13 y HL-28	0,950794380252101
HL-1 y HL-5 y HL-31	0,955586922268908	HL-1 y HL-26 y HL-28	0,950794380252101
HL-1 y HL-10 y HL-33	0,955586922268908	HL-1 y HL-26 y HL-47	0,950794380252101
HL-1 y HL-3 y HL-28	0,955455619747899	HL-26 y HL-27 y HL-53	0,950794380252101
HL-4 y HL-10 y HL-21	0,955389968487395	HL-1 y HL-3 y HL-32	0,950761554621849
HL-3 y HL-5 y HL-26	0,955225840336134	HL-8 y HL-10 y HL-26	0,950761554621849
HL-1 y HL-10 y HL-37	0,955127363445378	HL-8 y HL-10 y HL-21	0,950728728991596
HL-1 y HL-3 y HL-22	0,955028886554622	HL-8 y HL-18 y HL-53	0,950728728991596
HL-1 y HL-5 y HL-18	0,954930409663866	HL-13 y HL-21 y HL-53	0,950728728991596
HL-1 y HL-10 y HL-25	0,954930409663866	HL-3 y HL-10 y HL-18	0,950695903361345
HL-1 y HL-10 y HL-51	0,954930409663866	HL-10 y HL-17 y HL-53	0,950695903361345
HL-25 y HL-26 y HL-53	0,954766281512605	HL-1 y HL-5 y HL-49	0,950695903361344
HL-1 y HL-10 y HL-32	0,954634978991597	HL-1 y HL-8 y HL-27	0,950663077731093
HL-1 y HL-10 y HL-21	0,954569327731093	HL-1 y HL-5 y HL-15	0,950663077731092
HL-3 y HL-4 y HL-26	0,95453650210084	HL-5 y HL-11 y HL-25	0,950630252100841
HL-8 y HL-22 y HL-26	0,954306722689076	HL-1 y HL-10 y HL-45	0,950498949579832
HL-1 y HL-10 y HL-40	0,954273897058824	HL-8 y HL-11 y HL-13	0,950498949579832
HL-10 y HL-26 y HL-53	0,954175420168067	HL-10 y HL-11 y HL-21	0,950498949579832
HL-1 y HL-5 y HL-57	0,954109768907563	HL-1 y HL-8 y HL-25	0,95046612394958
HL-1 y HL-5 y HL-46	0,953978466386555	HL-4 y HL-26 y HL-35	0,950433298319328
HL-1 y HL-3 y HL-26	0,953847163865546	HL-8 y HL-26 y HL-28	0,950433298319328
HL-1 y HL-3 y HL-35	0,953814338235294	HL-8 y HL-26 y HL-51	0,950433298319328
HL-3 y HL-10 y HL-21	0,953715861344538	HL-10 y HL-22 y HL-53	0,950433298319328
HL-5 y HL-11 y HL-13	0,953715861344538	HL-5 y HL-11 y HL-57	0,950367647058824
HL-10 y HL-25 y HL-53	0,953715861344538	HL-8 y HL-11 y HL-53	0,950367647058824
HL-3 y HL-18 y HL-53	0,953617384453781	HL-3 y HL-8 y HL-21	0,950367647058823
HL-4 y HL-10 y HL-11	0,953584558823529	HL-26 y HL-35 y HL-53	0,950367647058823
HL-1 y HL-10 y HL-53	0,953551733193278	HL-8 y HL-35 y HL-53	0,950334821428571
HL-1 y HL-10 y HL-31	0,953551733193277	HL-1 y HL-22 y HL-28	0,950269170168067
HL-5 y HL-10 y HL-57	0,953518907563025	HL-22 y HL-25 y HL-26	0,950236344537815
HL-10 y HL-21 y HL-22	0,953518907563025	HL-1 y HL-3 y HL-40	0,950203518907563
HL-1 y HL-3 y HL-47	0,953486081932774	HL-1 y HL-9 y HL-10	0,950105042016807
HL-1 y HL-10 y HL-17	0,953387605042017	HL-3 y HL-8 y HL-18	0,950105042016807
HL-1 y HL-10 y HL-18	0,953387605042017	HL-5 y HL-8 y HL-21	0,950105042016807
HL-3 y HL-22 y HL-26	0,953354779411765	HL-3 y HL-8 y HL-9	0,950105042016806
HL-3 y HL-5 y HL-11	0,953354779411764	HL-5 y HL-17 y HL-45	0,950039390756303

Tabla 9: AUC obtenidos superiores a 0,96 al determinar una baja diversidad intestinal mediante la detección de la presencia o ausencia de 50 genes bacterianos de la combinación dada de 4 especies bacterianas.

Combinación de agrupaciones	AUC
HL-3; HL-8; HL-26 y HL-53	0,975380777310924
HL-8; HL-13; HL-26 y HL-53	0,974658613445378
HL-8; HL-13; HL-26 y HL-35	0,972098214285714
HL-8; HL-26; HL-27 y HL-53	0,971179096638655
HL-8; HL-25; HL-26 y HL-53	0,970522584033613
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-17	0,970391281512605
HL-8; HL-26; HL-35 y HL-53	0,970161502100841
HL-8; HL-13; HL-26 y HL-47	0,969800420168067
HL-8; HL-10; HL-26 y HL-53	0,969669117647059
HL-8; HL-21; HL-26 y HL-53	0,969669117647059
HL-3; HL-8; HL-26 y HL-51	0,969603466386555
HL-5; HL-8; HL-10 y HL-17	0,96937368697479

Combinación de agrupaciones	AUC
HL-8; HL-13; HL-26 y HL-51	0,969209558823529
HL-8; HL-26; HL-33 y HL-53	0,968881302521009
HL-8; HL-13; HL-18 y HL-26	0,968881302521008
HL-8; HL-26; HL-47 y HL-53	0,968815651260504
HL-5; HL-10; HL-17 y HL-22	0,968553046218488
HL-1; HL-4; HL-5 y HL-10	0,968290441176471
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-17	0,968224789915966
HL-8; HL-12; HL-26 y HL-53	0,968224789915966
HL-5; HL-8; HL-17 y HL-45	0,968159138655462
HL-8; HL-10; HL-13 y HL-26	0,968159138655462
HL-3; HL-8; HL-13 y HL-26	0,968093487394958
HL-8; HL-26; HL-51 y HL-53	0,968027836134454
HL-1; HL-5; HL-8 y HL-17	0,96796218487395
HL-3; HL-8; HL-26 y HL-35	0,967929359243697
HL-8; HL-26; HL-37 y HL-53	0,967863707983194
HL-8; HL-26; HL-27 y HL-35	0,967732405462185
HL-8; HL-10; HL-21 y HL-53	0,967699579831933
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-10	0,967633928571429
HL-3; HL-5; HL-10 y HL-17	0,967633928571429
HL-1; HL-5; HL-8 y HL-10	0,967568277310925
HL-8; HL-26; HL-31 y HL-53	0,96750262605042
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-27	0,967469800420168
HL-5; HL-10; HL-13 y HL-17	0,967436974789916
HL-3; HL-8; HL-10 y HL-26	0,967305672268908
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-35	0,967240021008404
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-32	0,967240021008403
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-47	0,967108718487395
HL-5; HL-10; HL-17 y HL-27	0,966911764705883
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-36	0,966911764705882
HL-3; HL-8; HL-26 y HL-47	0,966911764705882
HL-8; HL-10; HL-27 y HL-53	0,966911764705882
HL-4; HL-8; HL-26 y HL-53	0,966878939075631
HL-3; HL-8; HL-18 y HL-26	0,966846113445378
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-26	0,966813287815126
HL-8; HL-10; HL-13 y HL-53	0,966813287815126
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-12	0,966780462184874
HL-1; HL-5; HL-17 y HL-28	0,966780462184874
HL-3; HL-4; HL-8 y HL-26	0,966780462184874
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-13	0,96671481092437
HL-8; HL-10; HL-17 y HL-53	0,966583508403361
HL-3; HL-8; HL-10 y HL-53	0,966550682773109
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-28	0,966485031512605
HL-5; HL-8; HL-13 y HL-17	0,966320903361345
HL-3; HL-5; HL-8 y HL-17	0,966320903361344
HL-8; HL-13; HL-26 y HL-28	0,966320903361344
HL-8; HL-26; HL-27 y HL-47	0,966320903361344
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-22	0,966255252100841
HL-1; HL-5; HL-17 y HL-47	0,96625525210084
HL-8; HL-13; HL-26 y HL-37	0,966156775210084
HL-8; HL-22; HL-26 y HL-53	0,966156775210084
HL-8; HL-10; HL-11 y HL-21	0,966123949579832
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-28	0,96609112394958
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-25	0,966058298319328
HL-10; HL-25; HL-26 y HL-53	0,966058298319328
HL-5; HL-8; HL-11 y HL-26	0,965926995798319
HL-8; HL-13; HL-25 y HL-26	0,965926995798319
HL-5; HL-10; HL-17 y HL-45	0,965861344537815
HL-10; HL-13; HL-21 y HL-53	0,965762867647059
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-35	0,965730042016807
HL-4; HL-5; HL-10 y HL-17	0,965730042016807
HL-4; HL-8; HL-13 y HL-26	0,965730042016807
HL-8; HL-10; HL-11 y HL-26	0,965730042016807

Combinación de agrupaciones	AUC
HL-8; HL-10; HL-11 y HL-27	0,965730042016806
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-21	0,965664390756303
HL-3; HL-8; HL-12 y HL-26	0,965664390756303
HL-3; HL-8; HL-22 y HL-26	0,965664390756302
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-23	0,965598739495799
HL-3; HL-8; HL-21 y HL-53	0,965598739495798
HL-3; HL-10; HL-21 y HL-53	0,965598739495798
HL-4; HL-10; HL-21 y HL-27	0,965598739495798
HL-8; HL-18; HL-26 y HL-53	0,965598739495798
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-33	0,965565913865547
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-37	0,965500262605042
HL-3; HL-8; HL-26 y HL-37	0,965500262605042
HL-4; HL-8; HL-26 y HL-35	0,965500262605042
HL-3; HL-8; HL-26 y HL-32	0,96546743697479
HL-4; HL-10; HL-21 y HL-26	0,96546743697479
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-51	0,965434611344538
HL-1; HL-5; HL-28 y HL-47	0,965401785714286
HL-8; HL-13; HL-26 y HL-33	0,965401785714286
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-40	0,965368960084034
HL-3; HL-13; HL-26 y HL-53	0,965368960084034
HL-5; HL-10; HL-17 y HL-25	0,965368960084034
HL-1; HL-4; HL-5 y HL-28	0,965336134453782
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-11	0,965336134453781
HL-8; HL-26; HL-40 y HL-53	0,965336134453781
HL-5; HL-8; HL-11 y HL-17	0,965270483193278
HL-8; HL-21; HL-26 y HL-27	0,965270483193277
HL-4; HL-5; HL-8 y HL-17	0,965139180672269
HL-4; HL-10; HL-21 y HL-53	0,965106355042017
HL-5; HL-10; HL-17 y HL-26	0,965106355042017
HL-10; HL-13; HL-26 y HL-53	0,965073529411765
HL-3; HL-8; HL-26 y HL-45	0,965007878151261
HL-1; HL-3; HL-4 y HL-5	0,964942226890757
HL-5; HL-10; HL-11 y HL-17	0,964942226890757
HL-3; HL-8; HL-26 y HL-40	0,964942226890756
HL-5; HL-8; HL-17 y HL-26	0,964942226890756
HL-5; HL-10; HL-17 y HL-53	0,964942226890756
HL-8; HL-13; HL-35 y HL-53	0,964942226890756
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-53	0,964909401260505
HL-1; HL-5; HL-8 y HL-28	0,964876575630253
HL-4; HL-8; HL-21 y HL-26	0,964876575630252
HL-8; HL-26; HL-28 y HL-53	0,964876575630252
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-8	0,96484375
HL-3; HL-5; HL-8 y HL-26	0,96484375
HL-3; HL-8; HL-11 y HL-26	0,964810924369748
HL-8; HL-10; HL-11 y HL-35	0,964810924369748
HL-8; HL-12; HL-13 y HL-26	0,964810924369748
HL-8; HL-12; HL-26 y HL-35	0,964810924369748
HL-8; HL-13; HL-22 y HL-26	0,964810924369748
HL-8; HL-23; HL-26 y HL-53	0,964810924369748
HL-10; HL-13; HL-18 y HL-26	0,964745273109244
HL-1; HL-5; HL-28 y HL-35	0,964712447478992
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-31	0,96467962184874
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-45	0,96467962184874
HL-4; HL-8; HL-26 y HL-47	0,964679621848739
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-26	0,964646796218488
HL-1; HL-5; HL-8 y HL-35	0,964613970588236
HL-3; HL-8; HL-11 y HL-37	0,964613970588235
HL-3; HL-5; HL-8 y HL-11	0,964548319327731
HL-8; HL-18; HL-26 y HL-35	0,964548319327731
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-22	0,964482668067227
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-32	0,964482668067227
HL-1; HL-5; HL-17 y HL-26	0,964482668067227

Combinación de agrupaciones	AUC
HL-5; HL-10; HL-17 y HL-31	0,964482668067227
HL-10; HL-21; HL-26 y HL-53	0,964482668067227
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-47	0,964449842436975
HL-5; HL-8; HL-13 y HL-26	0,964449842436975
HL-1; HL-5; HL-35 y HL-47	0,964417016806723
HL-3; HL-5; HL-13 y HL-17	0,964417016806723
HL-3; HL-8; HL-26 y HL-27	0,964417016806723
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-33	0,964384191176471
HL-10; HL-13; HL-21 y HL-26	0,964384191176471
HL-1; HL-5; HL-17 y HL-45	0,964351365546219
HL-3; HL-10; HL-17 y HL-53	0,964351365546219
HL-10; HL-21; HL-22 y HL-26	0,964351365546219
HL-3; HL-8; HL-21 y HL-26	0,964351365546218
HL-3; HL-10; HL-21 y HL-26	0,964351365546218
HL-8; HL-21; HL-26 y HL-31	0,964351365546218
HL-1; HL-5; HL-26 y HL-28	0,964285714285715
HL-1; HL-5; HL-12 y HL-17	0,964285714285714
HL-4; HL-8; HL-26 y HL-27	0,964252888655462
HL-8; HL-22; HL-26 y HL-47	0,964252888655462
HL-10; HL-21; HL-26 y HL-27	0,964252888655462
HL-1; HL-4; HL-5 y HL-17	0,96422006302521
HL-1; HL-4; HL-5 y HL-35	0,96422006302521
HL-1; HL-5; HL-17 y HL-33	0,96422006302521
HL-3; HL-10; HL-26 y HL-53	0,96422006302521
HL-8; HL-10; HL-11 y HL-37	0,96422006302521
HL-13; HL-26; HL-47 y HL-53	0,96422006302521
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-27	0,964187237394958
HL-1; HL-5; HL-12 y HL-28	0,964154411764706
HL-8; HL-10; HL-11 y HL-13	0,964154411764706
HL-10; HL-15; HL-21 y HL-53	0,964154411764706
HL-10; HL-21; HL-22 y HL-53	0,964154411764706
HL-10; HL-21; HL-27 y HL-53	0,964154411764706
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-25	0,964121586134454
HL-3; HL-18; HL-26 y HL-32	0,964121586134454
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-36	0,964088760504202
HL-1; HL-5; HL-13 y HL-28	0,964088760504202
HL-3; HL-8; HL-26 y HL-28	0,964088760504202
HL-3; HL-8; HL-10 y HL-11	0,964088760504201
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-13	0,96405593487395
HL-1; HL-5; HL-13 y HL-17	0,964023109243697
HL-8; HL-10; HL-26 y HL-47	0,964023109243697
HL-8; HL-13; HL-21 y HL-26	0,964023109243697
HL-8; HL-13; HL-21 y HL-53	0,964023109243697
HL-1; HL-5; HL-27 y HL-28	0,963990283613446
HL-5; HL-10; HL-17 y HL-37	0,963990283613446
HL-5; HL-8; HL-10 y HL-13	0,963990283613445
HL-1; HL-4; HL-5 y HL-47	0,963957457983193
HL-1; HL-5; HL-17 y HL-27	0,963957457983193
HL-1; HL-5; HL-17 y HL-35	0,963957457983193
HL-1; HL-5; HL-22 y HL-28	0,963924632352942
HL-8; HL-10; HL-21 y HL-26	0,963924632352941
HL-1; HL-5; HL-17 y HL-53	0,963891806722689
HL-1; HL-5; HL-28 y HL-32	0,963891806722689
HL-3; HL-8; HL-26 y HL-33	0,963891806722689
HL-8; HL-10; HL-17 y HL-45	0,963891806722689
HL-3; HL-8; HL-11 y HL-35	0,963826155462185
HL-3; HL-18; HL-26 y HL-53	0,963826155462185
HL-7; HL-10; HL-21 y HL-53	0,963826155462185
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-11	0,963760504201681
HL-1; HL-4; HL-5 y HL-8	0,963760504201681
HL-1; HL-5; HL-8 y HL-9	0,963760504201681
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-18	0,963760504201681

Combinación de agrupaciones	AUC
HL-10; HL-21; HL-37 y HL-53	0,963760504201681
HL-4; HL-8; HL-10 y HL-26	0,96376050420168
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-12	0,963727678571429
HL-1; HL-5; HL-8 y HL-47	0,963727678571429
HL-5; HL-10; HL-11 y HL-26	0,963694852941177
HL-8; HL-13; HL-18 y HL-53	0,963694852941176
HL-8; HL-13; HL-26 y HL-45	0,963694852941176
HL-1; HL-5; HL-8 y HL-25	0,963662027310925
HL-3; HL-7; HL-10 y HL-21	0,963662027310925
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-53	0,963596376050421
HL-1; HL-5; HL-8 y HL-33	0,963596376050421
HL-1; HL-5; HL-8 y HL-53	0,963596376050421
HL-1; HL-5; HL-25 y HL-47	0,963596376050421
HL-5; HL-10; HL-17 y HL-35	0,96359637605042
HL-1; HL-5; HL-11 y HL-17	0,963563550420169
HL-1; HL-5; HL-17 y HL-23	0,963563550420168
HL-1; HL-5; HL-28 y HL-36	0,963563550420168
HL-7; HL-8; HL-21 y HL-26	0,963563550420168
HL-8; HL-10; HL-11 y HL-53	0,963563550420168
HL-8; HL-13; HL-26 y HL-40	0,963563550420168
HL-10; HL-13; HL-35 y HL-53	0,963563550420168
HL-1; HL-5; HL-26 y HL-47	0,963530724789917
HL-8; HL-12; HL-26 y HL-47	0,963530724789916
HL-3; HL-5; HL-17 y HL-26	0,963497899159664
HL-5; HL-8; HL-11 y HL-21	0,963497899159664
HL-8; HL-26; HL-31 y HL-47	0,963497899159664
HL-1; HL-5; HL-8 y HL-26	0,963465073529412
HL-1; HL-5; HL-17 y HL-22	0,96343224789916
HL-3; HL-8; HL-11 y HL-21	0,96343224789916
HL-3; HL-22; HL-26 y HL-47	0,96343224789916
HL-3; HL-25; HL-26 y HL-53	0,96343224789916
HL-5; HL-8; HL-17 y HL-36	0,96343224789916
HL-8; HL-11; HL-26 y HL-53	0,96343224789916
HL-3; HL-8; HL-25 y HL-26	0,963432247899159
HL-8; HL-13; HL-26 y HL-31	0,963432247899159
HL-8; HL-21; HL-26 y HL-35	0,963432247899159
HL-1; HL-5; HL-26 y HL-35	0,963399422268908
HL-1; HL-5; HL-33 y HL-47	0,963399422268908
HL-5; HL-8; HL-11 y HL-13	0,963366596638656
HL-7; HL-8; HL-21 y HL-53	0,963366596638656
HL-1; HL-5; HL-11 y HL-26	0,963366596638655
HL-3; HL-5; HL-17 y HL-45	0,963366596638655
HL-3; HL-8; HL-11 y HL-53	0,963366596638655
HL-8; HL-21; HL-26 y HL-51	0,963366596638655
HL-13; HL-26; HL-35 y HL-53	0,963366596638655
HL-4; HL-8; HL-25 y HL-26	0,963333771008403
HL-1; HL-5; HL-8 y HL-27	0,963300945378152
HL-1; HL-5; HL-17 y HL-25	0,963300945378151
HL-3; HL-4; HL-26 y HL-53	0,963300945378151
HL-8; HL-13; HL-18 y HL-35	0,963300945378151
HL-1; HL-5; HL-12 y HL-47	0,9632681197479
HL-1; HL-5; HL-17 y HL-40	0,963235294117647
HL-1; HL-5; HL-32 y HL-47	0,963235294117647
HL-3; HL-5; HL-11 y HL-26	0,963235294117647
HL-8; HL-22; HL-26 y HL-35	0,963235294117647
HL-8; HL-10; HL-17 y HL-27	0,963202468487395
HL-1; HL-4; HL-5 y HL-33	0,963169642857143
HL-4; HL-8; HL-26 y HL-33	0,963169642857143
HL-8; HL-10; HL-11 y HL-47	0,963169642857143
HL-10; HL-21; HL-25 y HL-53	0,963169642857142
HL-1; HL-5; HL-8 y HL-13	0,963136817226891
HL-5; HL-10; HL-17 y HL-23	0,963136817226891

Combinación de agrupaciones	AUC
HL-1; HL-5; HL-11 y HL-47	0,963103991596639
HL-8; HL-10; HL-11 y HL-40	0,963103991596639
HL-8; HL-10; HL-35 y HL-53	0,963103991596639
HL-1; HL-5; HL-21 y HL-28	0,963071165966387
HL-3; HL-26; HL-47 y HL-53	0,963071165966387
HL-1; HL-5; HL-11 y HL-21	0,963038340336135
HL-1; HL-5; HL-22 y HL-47	0,963038340336135
HL-1; HL-5; HL-28 y HL-33	0,963038340336135
HL-3; HL-5; HL-11 y HL-37	0,963038340336135
HL-1; HL-4; HL-5 y HL-25	0,963038340336134
HL-3; HL-5; HL-22 y HL-26	0,963038340336134
HL-8; HL-13; HL-26 y HL-32	0,963038340336134
HL-8; HL-21; HL-27 y HL-53	0,963038340336134
HL-8; HL-26; HL-27 y HL-51	0,963038340336134
HL-1; HL-5; HL-13 y HL-35	0,963005514705883
HL-1; HL-5; HL-13 y HL-47	0,963005514705883
HL-1; HL-5; HL-27 y HL-35	0,963005514705883
HL-1; HL-4; HL-5 y HL-26	0,962972689075631
HL-1; HL-5; HL-8 y HL-12	0,962972689075631
HL-1; HL-3; HL-8 y HL-10	0,96297268907563
HL-1; HL-5; HL-9 y HL-17	0,96297268907563
HL-3; HL-22; HL-26 y HL-53	0,96297268907563
HL-4; HL-10; HL-11 y HL-21	0,96297268907563
HL-5; HL-10; HL-11 y HL-13	0,96297268907563
HL-8; HL-15; HL-21 y HL-53	0,96297268907563
HL-10; HL-21; HL-22 y HL-27	0,96297268907563
HL-1; HL-3; HL-10 y HL-22	0,962939863445378
HL-3; HL-26; HL-37 y HL-53	0,962939863445378
HL-5; HL-8; HL-10 y HL-11	0,962907037815126
HL-5; HL-10; HL-13 y HL-26	0,962874212184874
HL-8; HL-18; HL-21 y HL-53	0,962874212184873
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-9	0,962841386554622
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-23	0,962841386554622
HL-5; HL-8; HL-11 y HL-35	0,962841386554622
HL-5; HL-10; HL-17 y HL-28	0,962841386554622
HL-5; HL-10; HL-17 y HL-47	0,962841386554622
HL-8; HL-18; HL-26 y HL-27	0,962841386554622
HL-1; HL-5; HL-33 y HL-35	0,96280856092437
HL-3; HL-4; HL-5 y HL-17	0,96280856092437
HL-1; HL-5; HL-11 y HL-35	0,962775735294118
HL-1; HL-5; HL-28 y HL-37	0,962775735294118
HL-5; HL-8; HL-11 y HL-45	0,962775735294118
HL-5; HL-8; HL-17 y HL-31	0,962775735294118
HL-5; HL-10; HL-17 y HL-36	0,962775735294118
HL-8; HL-12; HL-21 y HL-53	0,962775735294118
HL-1; HL-5; HL-11 y HL-28	0,962775735294117
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-40	0,962742909663866
HL-1; HL-5; HL-25 y HL-28	0,962742909663866
HL-8; HL-18; HL-26 y HL-47	0,962742909663865
HL-1; HL-5; HL-8 y HL-22	0,962710084033614
HL-1; HL-5; HL-12 y HL-35	0,962710084033614
HL-1; HL-5; HL-17 y HL-37	0,962710084033614
HL-1; HL-5; HL-25 y HL-35	0,962710084033614
HL-5; HL-8; HL-17 y HL-27	0,962710084033614
HL-1; HL-5; HL-7 y HL-17	0,962710084033613
HL-3; HL-8; HL-18 y HL-53	0,962710084033613
HL-3; HL-8; HL-26 y HL-31	0,962710084033613
HL-8; HL-10; HL-26 y HL-27	0,962710084033613
HL-8; HL-13; HL-26 y HL-49	0,962710084033613
HL-8; HL-21; HL-37 y HL-53	0,962710084033613
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-37	0,962677258403362
HL-1; HL-5; HL-23 y HL-28	0,962677258403362

Combinación de agrupaciones	AUC
HL-1; HL-5; HL-27 y HL-47	0,962677258403362
HL-1; HL-5; HL-28 y HL-51	0,962677258403362
HL-8; HL-10; HL-18 y HL-26	0,962677258403361
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-51	0,96264443277311
HL-1; HL-5; HL-8 y HL-11	0,962644432773109
HL-1; HL-5; HL-9 y HL-10	0,962644432773109
HL-5; HL-8; HL-11 y HL-27	0,962644432773109
HL-5; HL-8; HL-17 y HL-22	0,962644432773109
HL-8; HL-10; HL-33 y HL-53	0,962644432773109
HL-8; HL-13; HL-26 y HL-27	0,962644432773109
HL-8; HL-21; HL-26 y HL-37	0,962644432773109
HL-1; HL-8; HL-10 y HL-47	0,962611607142857
HL-1; HL-5; HL-11 y HL-40	0,962578781512606
HL-1; HL-5; HL-17 y HL-21	0,962578781512605
HL-3; HL-8; HL-11 y HL-40	0,962578781512605
HL-4; HL-10; HL-11 y HL-26	0,962578781512605
HL-5; HL-10; HL-12 y HL-17	0,962578781512605
HL-8; HL-21; HL-35 y HL-53	0,962578781512605
HL-1; HL-5; HL-25 y HL-26	0,962545955882353
HL-1; HL-4; HL-5 y HL-27	0,962513130252101
HL-1; HL-5; HL-32 y HL-35	0,962513130252101
HL-3; HL-21; HL-26 y HL-53	0,962513130252101
HL-10; HL-21; HL-35 y HL-53	0,962480304621849
HL-3; HL-8; HL-13 y HL-53	0,962480304621848
HL-1; HL-4; HL-5 y HL-13	0,962447478991597
HL-1; HL-5; HL-8 y HL-36	0,962447478991597
HL-1; HL-5; HL-17 y HL-36	0,962447478991597
HL-1; HL-5; HL-22 y HL-35	0,962447478991597
HL-3; HL-7; HL-21 y HL-53	0,962447478991597
HL-3; HL-13; HL-18 y HL-26	0,962447478991597
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-21	0,962414653361345
HL-3; HL-18; HL-22 y HL-26	0,962414653361344
HL-5; HL-10; HL-17 y HL-40	0,962381827731093
HL-1; HL-4; HL-5 y HL-12	0,962381827731092
HL-1; HL-4; HL-5 y HL-22	0,962381827731092
HL-1; HL-5; HL-11 y HL-27	0,962381827731092
HL-3; HL-10; HL-11 y HL-37	0,962381827731092
HL-8; HL-10; HL-11 y HL-33	0,962381827731092
HL-1; HL-5; HL-23 y HL-35	0,962316176470589
HL-1; HL-5; HL-28 y HL-40	0,962316176470589
HL-4; HL-5; HL-11 y HL-26	0,962316176470589
HL-4; HL-7; HL-10 y HL-21	0,962316176470589
HL-10; HL-13; HL-15 y HL-21	0,962316176470589
HL-1; HL-4; HL-5 y HL-53	0,962316176470588
HL-1; HL-5; HL-17 y HL-31	0,962316176470588
HL-5; HL-8; HL-11 y HL-37	0,962316176470588
HL-8; HL-10; HL-12 y HL-26	0,962316176470588
HL-4; HL-8; HL-21 y HL-53	0,962283350840335
HL-1; HL-5; HL-6 y HL-10	0,962250525210084
HL-1; HL-5; HL-35 y HL-36	0,962250525210084
HL-1; HL-5; HL-36 y HL-47	0,962250525210084
HL-3; HL-5; HL-17 y HL-36	0,962250525210084
HL-5; HL-11; HL-13 y HL-26	0,962250525210084
HL-8; HL-10; HL-16 y HL-17	0,962250525210084
HL-8; HL-26; HL-32 y HL-53	0,962250525210084
HL-8; HL-26; HL-40 y HL-47	0,962250525210084
HL-8; HL-26; HL-47 y HL-51	0,962250525210084
HL-10; HL-18; HL-21 y HL-53	0,962217699579831
HL-1; HL-5; HL-17 y HL-18	0,96218487394958
HL-1; HL-5; HL-17 y HL-51	0,96218487394958
HL-1; HL-5; HL-26 y HL-33	0,96218487394958
HL-3; HL-8; HL-11 y HL-27	0,96218487394958

Combinación de agrupaciones	AUC
HL-4; HL-21; HL-26 y HL-27	0,96218487394958
HL-5; HL-8; HL-17 y HL-53	0,96218487394958
HL-8; HL-10; HL-11 y HL-45	0,96218487394958
HL-8; HL-10; HL-21 y HL-27	0,96218487394958
HL-1; HL-3; HL-10 y HL-13	0,962119222689076
HL-1; HL-5; HL-11 y HL-12	0,962119222689076
HL-1; HL-10; HL-22 y HL-28	0,962119222689076
HL-8; HL-10; HL-11 y HL-22	0,962119222689075
HL-8; HL-21; HL-26 y HL-40	0,962119222689075
HL-1; HL-3; HL-10 y HL-26	0,962086397058824
HL-1; HL-5; HL-8 y HL-40	0,962086397058824
HL-1; HL-5; HL-22 y HL-26	0,962086397058824
HL-1; HL-3; HL-10 y HL-28	0,962053571428572
HL-1; HL-5; HL-13 y HL-33	0,962053571428572
HL-3; HL-5; HL-11 y HL-17	0,962053571428572
HL-3; HL-8; HL-35 y HL-53	0,962053571428571
HL-4; HL-8; HL-10 y HL-11	0,962053571428571
HL-8; HL-22; HL-25 y HL-26	0,962053571428571
HL-10; HL-12; HL-21 y HL-53	0,962053571428571
HL-1; HL-5; HL-12 y HL-25	0,96202074579832
HL-3; HL-4; HL-10 y HL-21	0,962020745798319
HL-8; HL-12; HL-21 y HL-26	0,962020745798319
HL-10; HL-22; HL-25 y HL-53	0,962020745798319
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-49	0,961987920168068
HL-1; HL-5; HL-8 y HL-32	0,961987920168067
HL-1; HL-5; HL-11 y HL-13	0,961987920168067
HL-1; HL-8; HL-10 y HL-27	0,961987920168067
HL-3; HL-8; HL-17 y HL-45	0,961987920168067
HL-5; HL-10; HL-22 y HL-25	0,961987920168067
HL-1; HL-8; HL-10 y HL-22	0,961955094537815
HL-1; HL-8; HL-10 y HL-26	0,961955094537815
HL-1; HL-3; HL-10 y HL-35	0,961922268907563
HL-3; HL-5; HL-8 y HL-10	0,961922268907563
HL-5; HL-10; HL-17 y HL-51	0,961922268907563
HL-8; HL-10; HL-26 y HL-45	0,961922268907563
HL-10; HL-13; HL-26 y HL-47	0,961922268907563
HL-10; HL-21; HL-26 y HL-32	0,961889443277311
HL-1; HL-8; HL-10 y HL-35	0,961856617647059
HL-3; HL-4; HL-21 y HL-26	0,961856617647059
HL-3; HL-5; HL-11 y HL-13	0,961856617647059
HL-3; HL-8; HL-11 y HL-47	0,961856617647059
HL-3; HL-26; HL-35 y HL-53	0,961856617647059
HL-8; HL-18; HL-25 y HL-26	0,961856617647059
HL-10; HL-11; HL-26 y HL-53	0,961856617647059
HL-10; HL-13; HL-25 y HL-26	0,961856617647059
HL-5; HL-10; HL-11 y HL-37	0,961856617647058
HL-1; HL-5; HL-12 y HL-33	0,961823792016807
HL-1; HL-5; HL-13 y HL-25	0,961823792016807
HL-1; HL-5; HL-47 y HL-53	0,961823792016807
HL-8; HL-26; HL-35 y HL-40	0,961823792016807
HL-8; HL-21; HL-26 y HL-33	0,961823792016806
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-31	0,961790966386555
HL-1; HL-4; HL-8 y HL-10	0,961790966386555
HL-1; HL-5; HL-9 y HL-47	0,961790966386555
HL-1; HL-5; HL-11 y HL-25	0,961790966386555
HL-3; HL-23; HL-26 y HL-53	0,961790966386555
HL-13; HL-22; HL-26 y HL-47	0,961790966386554
HL-1; HL-5; HL-12 y HL-26	0,961758140756303
HL-1; HL-5; HL-28 y HL-31	0,961758140756303
HL-8; HL-26; HL-32 y HL-47	0,961758140756303
HL-10; HL-21; HL-26 y HL-37	0,961758140756303
HL-4; HL-10; HL-15 y HL-21	0,961758140756302

Combinación de agrupaciones	AUC
HL-1; HL-3; HL-10 y HL-27	0,961725315126051
HL-1; HL-3; HL-10 y HL-47	0,961725315126051
HL-1; HL-5; HL-27 y HL-33	0,961725315126051
HL-5; HL-8; HL-17 y HL-40	0,961725315126051
HL-7; HL-8; HL-13 y HL-21	0,961725315126051
HL-7; HL-13; HL-21 y HL-53	0,961725315126051
HL-8; HL-11; HL-26 y HL-47	0,961725315126051
HL-8; HL-13; HL-23 y HL-26	0,961725315126051
HL-4; HL-10; HL-11 y HL-27	0,96172531512605
HL-5; HL-8; HL-13 y HL-35	0,96172531512605
HL-8; HL-10; HL-26 y HL-35	0,96172531512605
HL-8; HL-21; HL-25 y HL-26	0,96172531512605
HL-8; HL-26; HL-31 y HL-35	0,96172531512605
HL-3; HL-5; HL-10 y HL-26	0,961692489495798
HL-1; HL-5; HL-13 y HL-26	0,961659663865547
HL-5; HL-11; HL-13 y HL-35	0,961659663865547
HL-1; HL-5; HL-26 y HL-32	0,961659663865546
HL-1; HL-8; HL-10 y HL-13	0,961659663865546
HL-3; HL-8; HL-9 y HL-26	0,961659663865546
HL-3; HL-8; HL-21 y HL-36	0,961659663865546
HL-5; HL-10; HL-11 y HL-27	0,961659663865546
HL-5; HL-11; HL-13 y HL-39	0,961659663865546
HL-8; HL-10; HL-11 y HL-25	0,961659663865546
HL-8; HL-21; HL-33 y HL-53	0,961659663865546
HL-5; HL-11; HL-13 y HL-17	0,961594012605043
HL-1; HL-3; HL-10 y HL-23	0,961594012605042
HL-1; HL-5; HL-26 y HL-27	0,961594012605042
HL-3; HL-5; HL-10 y HL-11	0,961594012605042
HL-5; HL-10; HL-11 y HL-35	0,961594012605042
HL-8; HL-11; HL-26 y HL-27	0,961594012605042
HL-8; HL-11; HL-26 y HL-37	0,961594012605042
HL-8; HL-27; HL-35 y HL-53	0,961594012605042
HL-10; HL-21; HL-33 y HL-53	0,961594012605042
HL-10; HL-27; HL-35 y HL-53	0,961594012605042
HL-13; HL-25; HL-26 y HL-53	0,961594012605042
HL-1; HL-5; HL-35 y HL-53	0,96156118697479
HL-3; HL-7; HL-8 y HL-21	0,96156118697479
HL-5; HL-8; HL-26 y HL-53	0,96156118697479
HL-5; HL-10; HL-17 y HL-21	0,96156118697479
HL-5; HL-10; HL-17 y HL-33	0,96156118697479
HL-8; HL-10; HL-27 y HL-35	0,96156118697479
HL-1; HL-5; HL-8 y HL-23	0,961528361344538
HL-1; HL-5; HL-28 y HL-45	0,961528361344538
HL-1; HL-5; HL-32 y HL-33	0,961528361344538
HL-1; HL-10; HL-22 y HL-47	0,961528361344538
HL-3; HL-5; HL-13 y HL-26	0,961528361344538
HL-3; HL-5; HL-17 y HL-22	0,961528361344538
HL-3; HL-8; HL-23 y HL-26	0,961528361344538
HL-8; HL-13; HL-27 y HL-53	0,961528361344538
HL-10; HL-11; HL-37 y HL-53	0,961528361344538
HL-1; HL-5; HL-11 y HL-53	0,961462710084034
HL-1; HL-5; HL-25 y HL-32	0,961462710084034
HL-3; HL-5; HL-11 y HL-35	0,961462710084034
HL-3; HL-10; HL-18 y HL-26	0,961462710084034
HL-8; HL-21; HL-22 y HL-26	0,961462710084034
HL-8; HL-26; HL-35 y HL-51	0,961462710084034
HL-10; HL-11; HL-21 y HL-53	0,961462710084034
HL-8; HL-26; HL-37 y HL-47	0,961462710084033
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-45	0,96139705882353
HL-1; HL-5; HL-12 y HL-22	0,96139705882353
HL-1; HL-5; HL-35 y HL-51	0,96139705882353
HL-5; HL-8; HL-11 y HL-12	0,96139705882353

Combinación de agrupaciones	AUC
HL-5; HL-10; HL-17 y HL-32	0,96139705882353
HL-1; HL-3; HL-10 y HL-32	0,961397058823529
HL-3; HL-10; HL-11 y HL-26	0,961397058823529
HL-5; HL-8; HL-17 y HL-21	0,961397058823529
HL-8; HL-10; HL-25 y HL-53	0,961397058823529
HL-10; HL-11; HL-26 y HL-27	0,961397058823529
HL-1; HL-5; HL-25 y HL-33	0,961364233193278
HL-10; HL-15; HL-21 y HL-22	0,961364233193278
HL-3; HL-10; HL-35 y HL-53	0,961364233193277
HL-1; HL-5; HL-8 y HL-21	0,961331407563026
HL-1; HL-5; HL-23 y HL-47	0,961331407563026
HL-1; HL-5; HL-12 y HL-36	0,961331407563025
HL-1; HL-5; HL-25 y HL-36	0,961331407563025
HL-3; HL-4; HL-21 y HL-53	0,961331407563025
HL-3; HL-5; HL-17 y HL-53	0,961331407563025
HL-3; HL-8; HL-11 y HL-33	0,961331407563025
HL-3; HL-10; HL-11 y HL-53	0,961331407563025
HL-4; HL-8; HL-11 y HL-26	0,961331407563025
HL-4; HL-8; HL-26 y HL-28	0,961331407563025
HL-4; HL-10; HL-25 y HL-26	0,961331407563025
HL-5; HL-8; HL-17 y HL-35	0,961331407563025
HL-5; HL-10; HL-11 y HL-25	0,961331407563025
HL-7; HL-10; HL-21 y HL-22	0,961331407563025
HL-8; HL-18; HL-21 y HL-26	0,961331407563025
HL-10; HL-21; HL-26 y HL-51	0,961331407563025
HL-13; HL-15; HL-21 y HL-53	0,961331407563025
HL-1; HL-5; HL-8 y HL-37	0,961298581932774
HL-1; HL-5; HL-22 y HL-27	0,961298581932774
HL-1; HL-5; HL-25 y HL-27	0,961298581932774
HL-1; HL-5; HL-35 y HL-37	0,961298581932774
HL-1; HL-5; HL-35 y HL-40	0,961298581932774
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-15	0,961298581932773
HL-1; HL-10; HL-28 y HL-47	0,961298581932773
HL-3; HL-8; HL-45 y HL-53	0,961298581932773
HL-10; HL-21; HL-51 y HL-53	0,961298581932773
HL-1; HL-8; HL-10 y HL-17	0,961265756302521
HL-3; HL-4; HL-5 y HL-11	0,961265756302521
HL-5; HL-8; HL-17 y HL-28	0,961265756302521
HL-5; HL-11; HL-25 y HL-26	0,961265756302521
HL-8; HL-10; HL-11 y HL-36	0,961265756302521
HL-10; HL-11; HL-13 y HL-26	0,961265756302521
HL-10; HL-21; HL-26 y HL-31	0,961265756302521
HL-1; HL-5; HL-37 y HL-47	0,961232930672269
HL-1; HL-10; HL-13 y HL-47	0,961232930672269
HL-1; HL-3; HL-4 y HL-10	0,961200105042017
HL-1; HL-4; HL-5 y HL-21	0,961200105042017
HL-1; HL-4; HL-5 y HL-40	0,961200105042017
HL-1; HL-5; HL-22 y HL-25	0,961200105042017
HL-1; HL-5; HL-28 y HL-53	0,961200105042017
HL-1; HL-5; HL-47 y HL-51	0,961200105042017
HL-3; HL-7; HL-21 y HL-26	0,961200105042017
HL-3; HL-10; HL-25 y HL-53	0,961200105042017
HL-4; HL-8; HL-26 y HL-37	0,961200105042017
HL-5; HL-10; HL-11 y HL-21	0,961200105042017
HL-10; HL-11; HL-21 y HL-37	0,961200105042017
HL-3; HL-4; HL-8 y HL-11	0,961200105042016
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-46	0,961167279411765
HL-1; HL-5; HL-12 y HL-27	0,961167279411765
HL-1; HL-4; HL-5 y HL-23	0,961134453781513
HL-1; HL-5; HL-11 y HL-36	0,961134453781513
HL-3; HL-8; HL-11 y HL-15	0,961134453781513
HL-8; HL-11; HL-12 y HL-26	0,961134453781513

Combinación de agrupaciones	AUC
HL-8; HL-12; HL-26 y HL-40	0,961134453781513
HL-1; HL-5; HL-33 y HL-36	0,961134453781512
HL-3; HL-13; HL-21 y HL-53	0,961134453781512
HL-5; HL-8; HL-35 y HL-45	0,961134453781512
HL-8; HL-21; HL-31 y HL-53	0,961134453781512
HL-1; HL-3; HL-10 y HL-51	0,961101628151261
HL-1; HL-5; HL-22 y HL-33	0,961101628151261
HL-3; HL-26; HL-33 y HL-53	0,96110162815126
HL-8; HL-26; HL-28 y HL-47	0,961068802521008
HL-1; HL-5; HL-8 y HL-51	0,961003151260505
HL-1; HL-5; HL-11 y HL-18	0,961003151260504
HL-1; HL-5; HL-11 y HL-37	0,961003151260504
HL-1; HL-10; HL-22 y HL-35	0,961003151260504
HL-3; HL-5; HL-25 y HL-26	0,961003151260504
HL-4; HL-5; HL-8 y HL-11	0,961003151260504
HL-5; HL-8; HL-11 y HL-47	0,961003151260504
HL-8; HL-11; HL-13 y HL-26	0,961003151260504
HL-8; HL-11; HL-21 y HL-26	0,961003151260504
HL-1; HL-5; HL-13 y HL-27	0,960970325630253
HL-1; HL-5; HL-40 y HL-47	0,960970325630253
HL-1; HL-5; HL-13 y HL-22	0,960970325630252
HL-1; HL-10; HL-27 y HL-28	0,960970325630252
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-46	0,960937500000001
HL-1; HL-5; HL-15 y HL-17	0,960937500000001
HL-1; HL-5; HL-12 y HL-32	0,9609375
HL-1; HL-5; HL-17 y HL-32	0,9609375
HL-1; HL-5; HL-17 y HL-39	0,9609375
HL-3; HL-5; HL-8 y HL-45	0,9609375
HL-4; HL-8; HL-26 y HL-31	0,9609375
HL-5; HL-8; HL-11 y HL-25	0,9609375
HL-5; HL-8; HL-17 y HL-37	0,9609375
HL-5; HL-10; HL-11 y HL-45	0,9609375
HL-8; HL-11; HL-26 y HL-35	0,9609375
HL-8; HL-21; HL-25 y HL-53	0,9609375
HL-10; HL-11; HL-13 y HL-53	0,9609375
HL-1; HL-8; HL-10 y HL-28	0,960904674369748
HL-1; HL-10; HL-27 y HL-47	0,960904674369748
HL-8; HL-10; HL-12 y HL-53	0,960904674369748
HL-1; HL-3; HL-10 y HL-17	0,960871848739496
HL-1; HL-4; HL-5 y HL-51	0,960871848739496
HL-1; HL-5; HL-11 y HL-22	0,960871848739496
HL-1; HL-5; HL-11 y HL-33	0,960871848739496
HL-1; HL-5; HL-13 y HL-53	0,960871848739496
HL-3; HL-4; HL-10 y HL-26	0,960871848739496
HL-3; HL-8; HL-11 y HL-13	0,960871848739496
HL-3; HL-18; HL-26 y HL-35	0,960871848739496
HL-7; HL-8; HL-13 y HL-26	0,960871848739496
HL-8; HL-13; HL-15 y HL-21	0,960871848739496
HL-8; HL-26; HL-35 y HL-45	0,960871848739496
HL-10; HL-11; HL-27 y HL-37	0,960871848739496
HL-1; HL-5; HL-18 y HL-28	0,960839023109244
HL-3; HL-26; HL-27 y HL-53	0,960839023109243
HL-3; HL-8; HL-9 y HL-45	0,960806197478992
HL-7; HL-10; HL-13 y HL-21	0,960806197478992
HL-8; HL-10; HL-11 y HL-17	0,960806197478992
HL-10; HL-26; HL-27 y HL-53	0,960806197478992
HL-3; HL-8; HL-27 y HL-53	0,960806197478991
HL-5; HL-17; HL-28 y HL-45	0,960806197478991
HL-8; HL-26; HL-35 y HL-47	0,960806197478991
HL-10; HL-18; HL-21 y HL-26	0,960806197478991
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-18	0,96077337184874
HL-1; HL-10; HL-28 y HL-35	0,96077337184874

Combinación de agrupaciones	AUC
HL-8; HL-12; HL-18 y HL-26	0,96077337184874
HL-5; HL-8; HL-17 y HL-25	0,960773371848739
HL-5; HL-8; HL-17 y HL-47	0,960773371848739
HL-5; HL-10; HL-17 y HL-18	0,960773371848739
HL-1; HL-5; HL-11 y HL-15	0,960740546218488
HL-1; HL-5; HL-23 y HL-25	0,960740546218488
HL-1; HL-5; HL-26 y HL-53	0,960740546218488
HL-10; HL-17; HL-25 y HL-53	0,960740546218488
HL-1; HL-4; HL-10 y HL-26	0,960740546218487
HL-1; HL-5; HL-9 y HL-35	0,960740546218487
HL-3; HL-8; HL-11 y HL-18	0,960740546218487
HL-3; HL-8; HL-18 y HL-45	0,960740546218487
HL-3; HL-18; HL-21 y HL-53	0,960740546218487
HL-3; HL-26; HL-51 y HL-53	0,960740546218487
HL-4; HL-10; HL-13 y HL-21	0,960740546218487
HL-4; HL-10; HL-13 y HL-26	0,960740546218487
HL-5; HL-10; HL-21 y HL-22	0,960740546218487
HL-8; HL-10; HL-11 y HL-12	0,960740546218487
HL-8; HL-10; HL-11 y HL-18	0,960740546218487
HL-8; HL-10; HL-17 y HL-31	0,960740546218487
HL-8; HL-12; HL-25 y HL-26	0,960740546218487
HL-8; HL-21; HL-51 y HL-53	0,960740546218487
HL-8; HL-25; HL-26 y HL-40	0,960740546218487
HL-1; HL-8; HL-10 y HL-12	0,960707720588236
HL-1; HL-8; HL-10 y HL-40	0,960707720588236
HL-5; HL-7; HL-10 y HL-17	0,960707720588236
HL-1; HL-5; HL-8 y HL-31	0,960674894957984
HL-1; HL-5; HL-12 y HL-13	0,960674894957984
HL-4; HL-5; HL-11 y HL-17	0,960674894957984
HL-1; HL-4; HL-5 y HL-37	0,960674894957983
HL-1; HL-4; HL-10 y HL-28	0,960674894957983
HL-1; HL-5; HL-11 y HL-45	0,960674894957983
HL-1; HL-10; HL-26 y HL-28	0,960674894957983
HL-3; HL-13; HL-18 y HL-53	0,960674894957983
HL-3; HL-18; HL-25 y HL-26	0,960674894957983
HL-5; HL-8; HL-12 y HL-17	0,960674894957983
HL-5; HL-10; HL-13 y HL-35	0,960674894957983
HL-8; HL-10; HL-13 y HL-45	0,960674894957983
HL-8; HL-10; HL-35 y HL-45	0,960674894957983
HL-8; HL-12; HL-26 y HL-37	0,960674894957983
HL-8; HL-13; HL-47 y HL-53	0,960674894957983
HL-8; HL-13; HL-51 y HL-53	0,960674894957983
HL-8; HL-21; HL-53 y HL-56	0,960674894957983
HL-13; HL-22; HL-26 y HL-53	0,960674894957983
HL-1; HL-3; HL-10 y HL-33	0,960642069327731
HL-8; HL-12; HL-26 y HL-31	0,960642069327731
HL-1; HL-5; HL-9 y HL-12	0,960609243697479
HL-1; HL-5; HL-21 y HL-36	0,960609243697479
HL-5; HL-8; HL-26 y HL-45	0,960609243697479
HL-8; HL-10; HL-17 y HL-36	0,960609243697479
HL-8; HL-21; HL-26 y HL-47	0,960609243697479
HL-8; HL-26; HL-35 y HL-37	0,960609243697479
HL-13; HL-21; HL-26 y HL-53	0,960609243697479
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-39	0,960576418067227
HL-1; HL-5; HL-33 y HL-51	0,960576418067227
HL-1; HL-10; HL-13 y HL-28	0,960576418067227
HL-1; HL-10; HL-22 y HL-27	0,960576418067227
HL-4; HL-10; HL-26 y HL-53	0,960576418067227
HL-10; HL-21; HL-27 y HL-37	0,960576418067227
HL-1; HL-5; HL-9 y HL-13	0,960543592436975
HL-1; HL-5; HL-9 y HL-26	0,960543592436975
HL-1; HL-10; HL-26 y HL-47	0,960543592436975

Combinación de agrupaciones	AUC
HL-3; HL-5; HL-17 y HL-28	0,960543592436975
HL-3; HL-5; HL-26 y HL-32	0,960543592436975
HL-4; HL-5; HL-11 y HL-13	0,960543592436975
HL-4; HL-13; HL-26 y HL-53	0,960543592436975
HL-5; HL-10; HL-11 y HL-22	0,960543592436975
HL-8; HL-26; HL-33 y HL-35	0,960543592436975
HL-8; HL-26; HL-33 y HL-47	0,960543592436975
HL-1; HL-3; HL-8 y HL-22	0,960510766806723
HL-1; HL-5; HL-12 y HL-53	0,960510766806723
HL-1; HL-5; HL-25 y HL-37	0,960510766806723
HL-13; HL-26; HL-37 y HL-53	0,960510766806723
HL-5; HL-8; HL-10 y HL-21	0,960510766806722
HL-1; HL-3; HL-10 y HL-40	0,960477941176471
HL-1; HL-4; HL-5 y HL-45	0,960477941176471
HL-1; HL-5; HL-12 y HL-23	0,960477941176471
HL-3; HL-5; HL-11 y HL-25	0,960477941176471
HL-3; HL-11; HL-37 y HL-53	0,960477941176471
HL-5; HL-8; HL-16 y HL-17	0,960477941176471
HL-5; HL-17; HL-25 y HL-45	0,960477941176471
HL-8; HL-26; HL-45 y HL-53	0,960477941176471
HL-10; HL-11; HL-22 y HL-27	0,960477941176471
HL-10; HL-21; HL-25 y HL-26	0,960477941176471
HL-8; HL-13; HL-22 y HL-53	0,96047794117647
HL-8; HL-22; HL-26 y HL-27	0,96047794117647
HL-10; HL-13; HL-25 y HL-53	0,96047794117647
HL-1; HL-5; HL-22 y HL-23	0,960445115546219
HL-1; HL-3; HL-10 y HL-37	0,960445115546218
HL-1; HL-10; HL-13 y HL-35	0,960445115546218
HL-3; HL-4; HL-10 y HL-53	0,960445115546218
HL-8; HL-12; HL-26 y HL-27	0,960445115546218
HL-8; HL-12; HL-26 y HL-51	0,960445115546218
HL-8; HL-13; HL-37 y HL-53	0,960445115546218
HL-13; HL-26; HL-33 y HL-53	0,960445115546218
HL-1; HL-5; HL-31 y HL-47	0,960412289915967
HL-8; HL-10; HL-11 y HL-49	0,960412289915967
HL-1; HL-4; HL-10 y HL-47	0,960412289915966
HL-1; HL-5; HL-7 y HL-21	0,960412289915966
HL-3; HL-4; HL-8 y HL-53	0,960412289915966
HL-3; HL-4; HL-13 y HL-26	0,960412289915966
HL-3; HL-8; HL-11 y HL-39	0,960412289915966
HL-7; HL-21; HL-25 y HL-53	0,960412289915966
HL-10; HL-11; HL-37 y HL-38	0,960412289915966
HL-10; HL-13; HL-47 y HL-53	0,960412289915966
HL-13; HL-18; HL-35 y HL-53	0,960412289915966
HL-1; HL-5; HL-8 y HL-45	0,960379464285715
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-14	0,960379464285715
HL-1; HL-5; HL-21 y HL-25	0,960379464285715
HL-1; HL-5; HL-26 y HL-51	0,960379464285715
HL-1; HL-8; HL-10 y HL-51	0,960379464285715
HL-3; HL-10; HL-22 y HL-53	0,960379464285714
HL-1; HL-5; HL-21 y HL-47	0,960346638655463
HL-1; HL-4; HL-5 y HL-11	0,960346638655462
HL-1; HL-5; HL-10 y HL-57	0,960346638655462
HL-3; HL-4; HL-10 y HL-11	0,960346638655462
HL-3; HL-4; HL-21 y HL-27	0,960346638655462
HL-3; HL-8; HL-12 y HL-53	0,960346638655462
HL-5; HL-8; HL-11 y HL-22	0,960346638655462
HL-8; HL-9; HL-10 y HL-45	0,960346638655462
HL-8; HL-10; HL-31 y HL-53	0,960346638655462
HL-8; HL-22; HL-26 y HL-51	0,960346638655462
HL-10; HL-11; HL-13 y HL-37	0,960346638655462
HL-15; HL-21; HL-25 y HL-53	0,960346638655462

Combinación de agrupaciones	AUC
HL-1; HL-5; HL-25 y HL-53	0,960313813025211
HL-1; HL-3; HL-10 y HL-12	0,96031381302521
HL-1; HL-5; HL-23 y HL-33	0,96031381302521
HL-1; HL-8; HL-10 y HL-33	0,96031381302521
HL-8; HL-12; HL-26 y HL-33	0,96031381302521
HL-1; HL-5; HL-9 y HL-27	0,960280987394958
HL-1; HL-5; HL-13 y HL-32	0,960280987394958
HL-1; HL-5; HL-33 y HL-37	0,960280987394958
HL-1; HL-8; HL-10 y HL-25	0,960280987394958
HL-3; HL-5; HL-11 y HL-22	0,960280987394958
HL-3; HL-10; HL-13 y HL-53	0,960280987394958
HL-4; HL-8; HL-15 y HL-21	0,960280987394958
HL-5; HL-8; HL-11 y HL-40	0,960280987394958
HL-5; HL-8; HL-21 y HL-26	0,960280987394958
HL-5; HL-11; HL-26 y HL-27	0,960280987394958
HL-8; HL-11; HL-21 y HL-53	0,960280987394958
HL-10; HL-11; HL-13 y HL-49	0,960280987394958
HL-10; HL-11; HL-27 y HL-53	0,960280987394958
HL-10; HL-21; HL-32 y HL-53	0,960280987394958
HL-1; HL-10; HL-12 y HL-22	0,960248161764706
HL-1; HL-10; HL-23 y HL-47	0,960248161764706
HL-1; HL-10; HL-35 y HL-47	0,960248161764706
HL-3; HL-5; HL-10 y HL-22	0,960248161764706
HL-4; HL-5; HL-10 y HL-21	0,960248161764706
HL-5; HL-8; HL-12 y HL-26	0,960248161764706
HL-10; HL-26; HL-35 y HL-53	0,960248161764706
HL-1; HL-4; HL-5 y HL-31	0,960215336134454
HL-1; HL-5; HL-9 y HL-25	0,960215336134454
HL-1; HL-5; HL-11 y HL-23	0,960215336134454
HL-1; HL-5; HL-25 y HL-51	0,960215336134454
HL-1; HL-5; HL-33 y HL-40	0,960215336134454
HL-1; HL-8; HL-10 y HL-32	0,960215336134454
HL-1; HL-10; HL-13 y HL-22	0,960215336134454
HL-1; HL-10; HL-27 y HL-35	0,960215336134454
HL-8; HL-10; HL-22 y HL-26	0,960215336134454
HL-8; HL-18; HL-26 y HL-51	0,960215336134454
HL-8; HL-21; HL-22 y HL-53	0,960215336134454
HL-10; HL-11; HL-13 y HL-15	0,960215336134454
HL-3; HL-10; HL-15 y HL-21	0,960215336134453
HL-4; HL-8; HL-18 y HL-26	0,960215336134453
HL-1; HL-5; HL-7 y HL-10	0,960182510504202
HL-1; HL-5; HL-25 y HL-40	0,960182510504202
HL-8; HL-18; HL-26 y HL-33	0,960182510504202
HL-3; HL-10; HL-18 y HL-53	0,960182510504201
HL-1; HL-4; HL-10 y HL-27	0,96014968487395
HL-1; HL-5; HL-27 y HL-32	0,96014968487395
HL-3; HL-8; HL-12 y HL-45	0,96014968487395
HL-3; HL-21; HL-26 y HL-32	0,96014968487395
HL-4; HL-5; HL-17 y HL-45	0,96014968487395
HL-8; HL-18; HL-26 y HL-31	0,96014968487395
HL-8; HL-21; HL-26 y HL-32	0,96014968487395
HL-3; HL-10; HL-37 y HL-53	0,960149684873949
HL-5; HL-8; HL-11 y HL-53	0,960149684873949
HL-5; HL-11; HL-17 y HL-45	0,960149684873949
HL-1; HL-3; HL-5 y HL-7	0,960116859243698
HL-1; HL-5; HL-13 y HL-23	0,960116859243698
HL-1; HL-5; HL-23 y HL-26	0,960116859243698
HL-4; HL-5; HL-13 y HL-17	0,960116859243698
HL-4; HL-8; HL-22 y HL-26	0,960116859243697
HL-8; HL-25; HL-26 y HL-27	0,960116859243697
HL-1; HL-4; HL-5 y HL-9	0,960084033613446
HL-3; HL-8; HL-11 y HL-36	0,960084033613446

Combinación de agrupaciones	AUC
HL-1; HL-5; HL-22 y HL-32	0,960084033613445
HL-3; HL-10; HL-11 y HL-22	0,960084033613445
HL-3; HL-10; HL-21 y HL-27	0,960084033613445
HL-3; HL-26; HL-31 y HL-53	0,960084033613445
HL-4; HL-5; HL-8 y HL-26	0,960084033613445
HL-4; HL-5; HL-25 y HL-26	0,960084033613445
HL-5; HL-8; HL-11 y HL-39	0,960084033613445
HL-8; HL-10; HL-45 y HL-53	0,960084033613445
HL-8; HL-13; HL-25 y HL-53	0,960051207983193
HL-1; HL-5; HL-26 y HL-40	0,960018382352942
HL-1; HL-5; HL-31 y HL-35	0,960018382352942
HL-1; HL-5; HL-33 y HL-53	0,960018382352942
HL-1; HL-5; HL-45 y HL-47	0,960018382352942
HL-1; HL-3; HL-8 y HL-35	0,960018382352941
HL-1; HL-3; HL-10 y HL-25	0,960018382352941
HL-1; HL-3; HL-10 y HL-36	0,960018382352941
HL-1; HL-5; HL-26 y HL-36	0,960018382352941
HL-1; HL-5; HL-27 y HL-36	0,960018382352941
HL-1; HL-10; HL-32 y HL-47	0,960018382352941
HL-3; HL-8; HL-11 y HL-45	0,960018382352941
HL-3; HL-18; HL-26 y HL-51	0,960018382352941
HL-5; HL-8; HL-10 y HL-26	0,960018382352941
HL-5; HL-10; HL-11 y HL-12	0,960018382352941
HL-5; HL-11; HL-13 y HL-21	0,960018382352941
HL-8; HL-21; HL-23 y HL-53	0,960018382352941
HL-8; HL-21; HL-26 y HL-56	0,960018382352941
HL-8; HL-25; HL-26 y HL-47	0,960018382352941
HL-8; HL-26; HL-32 y HL-35	0,960018382352941
HL-10; HL-13; HL-26 y HL-28	0,960018382352941
HL-10; HL-18; HL-26 y HL-32	0,960018382352941

Tabla 10: especies bacterianas y combinaciones de 2 a 20 especies bacterianas que proporcionan el mejor AUC en el procedimiento de la invención.

Combinaciones de especies bacterianas	AUC
HL-1	0,936055672
HL-1 y HL-5	0,955685399
HL-10, HL-1 y HL-5	0,964778099
HL-8, HL-3, HL-53 y HL-26	0,975380777
HL-10, HL-26, HL-8, HL-53 y HL-3	0,976070116
HL-53, HL-8, HL-13, HL-3, HL-26 y HL-37	0,97761292
HL-37, HL-26, HL-10, HL-8, HL-21, HL-53 y HL-11	0,979713761
HL-10, HL-5, HL-26, HL-25, HL-53, HL-22, HL-8 y HL-17	0,980370273
HL-26, HL-37, HL-21, HL-10, HL-5, HL-17, HL-16, HL-8 y HL-3	0,981026786
HL-15, HL-11, HL-27, HL-35, HL-8, HL-22, HL-47, HL-26, HL-10 y HL-37	0,983652836
HL-28, HL-21, HL-5, HL-27, HL-26, HL-17, HL-3, HL-38, HL-40, HL-37 y HL-25	0,981026786
HL-8, HL-45, HL-35, HL-53, HL-17, HL-26, HL-3, HL-18, HL-15, HL-10, HL-37 y HL-40	0,985556723
HL-33, HL-13, HL-10, HL-28, HL-36, HL-17, HL-8, HL-3, HL-22, HL-53, HL-35, HL-5 y HL-27	0,982405462
HL-56, HL-17, HL-21, HL-35, HL-40, HL-26, HL-12, HL-13, HL-45, HL-3, HL-5, HL-10, HL-8 y HL-27	0,983193277
HL-31, HL-11, HL-25, HL-10, HL-35, HL-12, HL-28, HL-37, HL-5, HL-15, HL-33, HL-17, HL-51, HL-27 y HL-40	0,981026786
HL-33, HL-51, HL-39, HL-27, HL-56, HL-31, HL-23, HL-10, HL-18, HL-4, HL-11, HL-8, HL-21, HL-45, HL-5 y HL-17	0,981617647
HL-45, HL-27, HL-47, HL-5, HL-51, HL-8, HL-26, HL-3, HL-53, HL-37, HL-13, HL-11, HL-38, HL-17, HL-23, HL-1 y HL-28	0,982602416
HL-31, HL-11, HL-33, HL-49, HL-38, HL-28, HL-36, HL-21, HL-22, HL-4, HL-37, HL-45, HL-27, HL-15, HL-51, HL-8, HL-17 y HL-56	0,982208508
HL-39, HL-18, HL-56, HL-28, HL-36, HL-45, HL-49, HL-7, HL-17, HL-35, HL-33, HL-11, HL-5, HL-8, HL-10, HL-12, HL-15, HL-25 y HL-22	0,981551996
HL-47, HL-5, HL-15, HL-36, HL-37, HL-35, HL-44, HL-11, HL-8, HL-17, HL-31, HL-18, HL-13, HL-21, HL-51, HL-4, HL-28, HL-45, HL-33 y HL-3	0,982536765

Referencias

- 5 1 Jorgensen, T. et al. A randomized non-pharmacological intervention study for prevention of ischaemic heart disease: baseline results Inter99. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 10, 377-386, doi:10.1097/01.hjr.0000096541.30533.82 (2003).
- 10 2 WHO. Obesity: preventing and managing the globalepidemic. Report of a WHO consultation. Tech. Rep. Ser. 894 (World Health Organisation, Geneva, 2000).
- 3 Treuth, M. S., Hunter, G. R. & Kekes-Szabo, T. Estimating intraabdominal adipose tissue in women by dual-energy X-ray absorptiometry. *Am J Clin Nutr* 62, 527-532 (1995).
- 15 4 Matthews, D. R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28, 412-419 (1985).
- 5 Manichanh, C. et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 55, 205-211, doi:gut.2005.073817 [pii] 10.1136/gut.2005.073817 (2006).
- 20 6 Li, R. et al. SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment. *Bioinformatics* 25, 1966-1967, doi:btp336 [pii] 10.1093/bioinformatics/btp336 (2009).
- 7 Oksanen, J. et al. *vegan: Community Ecology Package*. (2012).
- 25 8 Rajilic-Stojanovic, M. et al. Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environ Microbiol* 11, 1736-1751, doi:EMI1900 [pii] 10.1111/j.1462-2920.2009.01900.x (2009).
- 30 9 Qin, J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59-65, doi:nature08821 [pii] 10.1038/nature08821 (2010).
- 10 Arumugam, M. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473, 174-180, doi:nature09944 [pii] 10.1038/nature09944 (2011).
- 35 11 Benjamini, Y. H., Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testning. *Journal of the Royal Statistical Society* 57, 289-300 (1995).
- 12 Jensen, L. J. et al. eggNOG: automated construction and annotation of orthologous groups of genes. *Nucleic Acids Res* 36, D250-254, doi:gkm796 [pii] 10.1093/nar/gkm796 (2008).
- 40 13 Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M. & Tanabe, M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res* 40, D109-114, doi:gkr988 [pii] 10.1093/nar/gkr988 (2012).
- 45 14 Jiang, D., Huang, J. & Zhang, Y. The cross-validated AUC for MCP-logistic regression with high-dimensional data. *Stat Methods Med Res*, doi:0962280211428385 [pii] 10.1177/0962280211428385 (2011).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para determinar si un sujeto presenta una diversidad bacteriana intestinal reducida, comprendiendo dicho procedimiento:

a) detectar a partir de una muestra de ADN microbiano intestinal que ha sido obtenida de dicho sujeto si la totalidad de las 50 SEC ID nº de por lo menos una especie bacteriana como se define en la Tabla 1 se encuentran ausentes en dicha muestra; y

b) determinar que el sujeto presenta una diversidad bacteriana intestinal reducida, si dicha totalidad de 50 SEC ID nº de dicha por lo menos una especie bacteriana como se define en la Tabla 1 se encuentran ausentes en dicha muestra.

2. Procedimiento para determinar si un sujeto presenta una diversidad bacteriana intestinal reducida, comprendiendo dicho procedimiento:

a) detectar a partir de una muestra de ADN microbiano intestinal que ha sido obtenida a partir de dicho sujeto si la totalidad de 50 SEC ID nº de por lo menos una especie bacteriana como se define en la Tabla 2 se encuentran presentes en dicha muestra; y

b) determinar que el sujeto presenta una diversidad bacteriana intestinal reducida, si dicha totalidad de 50 SEC ID nº de dicha por lo menos una especie bacteriana como se define en la Tabla 2 se encuentran presentes en dicha muestra.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende una etapa de determinar a partir de una muestra de ADN microbiano intestinal que ha sido obtenida de dicho sujeto si la totalidad de 50 SEC ID nº de por lo menos una especie bacteriana como se define en la Tabla 1 seleccionadas de entre SEC ID nº 1-50, SEC ID nº 2801-2850, SEC ID nº 2601-2650, SEC ID nº 151-200, SEC ID nº 2651-2700, SEC ID nº 51-100, SEC ID nº 101-150, SEC ID nº 351-400, SEC ID nº 451-500, SEC ID nº 2201-2250, SEC ID nº 1051-1100, SEC ID nº 1251-1300, SEC ID nº 401-450, SEC ID nº 201-250, SEC ID nº 501-550, SEC ID nº 651-700, SEC ID nº 601-650, SEC ID nº 851-900, SEC ID nº 551-600 y SEC ID nº 1001-1050 se encuentran ausentes en dicha muestra.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que comprende una etapa de detectar a partir de una muestra de ADN microbiano intestinal que ha sido obtenida de dicho sujeto si la totalidad de 50 SEC ID nº de especies bacterianas como se define en la Tabla 1 o la Tabla 2 de combinaciones de especies bacterianas indicadas en las Tablas 7, 8 y/o 9 se encuentran ausentes y/o presentes en dicha muestra.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que comprende una etapa de detectar a partir de una muestra de ADN microbiano intestinal que ha sido obtenida de dicho sujeto si:

- SEC ID nº 1-50 y SEC ID nº 201-250 se encuentran ausentes en dicha muestra, o;
- SEC ID nº 451-500, SEC ID nº 1-50 y SEC ID nº 201-250 se encuentran ausentes en dicha muestra, o;
- SEC ID nº 351-400, SEC ID nº 101-150, SEC ID nº 1251-1300 y SEC ID nº 2601-2650 se encuentran ausentes en dicha muestra, o;
- SEC ID nº 451-500, SEC ID nº 1251-1300, SEC ID nº 351-400, SEC ID nº 2601-2650 y SEC ID nº 101-150 se encuentran ausentes en dicha muestra, o;
- SEC ID nº 2601-2650, SEC ID nº 351-400, SEC ID nº 601-650, SEC ID nº 101-150, SEC ID nº 1251-1300 y SEC ID nº 1801-1850 se encuentran ausentes en dicha muestra, o;
- SEC ID nº 1801-1850, SEC ID nº 1251-1300, SEC ID nº 451-500, SEC ID nº 351-400, SEC ID nº 1001-1050, SEC ID nº 2601-2650 y SEC ID nº 501-550 se encuentran ausentes en dicha muestra, o;
- SEC ID nº 451-500, SEC ID nº 201-250, SEC ID nº 1251-1300, SEC ID nº 1201-1250, SEC ID nº 2601-2650, SEC ID nº 1051-1100, SEC ID nº 351-400 y SEC ID nº 801-850 se encuentran ausentes en dicha muestra, o;
- SEC ID nº 1251-1300, SEC ID nº 1801-1850, SEC ID nº 1001-1050, SEC ID nº 451-500, SEC ID nº 201-250, SEC ID nº 801-850, SEC ID nº 751-800, SEC ID nº 351-400 y SEC ID nº 101-150 se encuentran ausentes en dicha muestra, o;
- SEC ID nº 501-550, SEC ID nº 1301-1350, SEC ID nº 1701-1750, SEC ID nº 351-400, SEC ID nº 1051-1100, SEC ID nº 2301-2350, SEC ID nº 1251-1300, SEC ID nº 451-500 y SEC ID nº 1801-1850 se

encuentran ausentes, y SEC ID nº 701-750 se encuentran presentes en dicha muestra;

- SEC ID nº 1351-1400, SEC ID nº 1001-1050, SEC ID nº 201-250, SEC ID nº 1301-1350, SEC ID nº 1251-1300, SEC ID nº 801-850, SEC ID nº 101-150, SEC ID nº 1951-2000, SEC ID nº 1801-1850 y SEC ID nº 1201-1250 se encuentran ausentes, y SEC ID nº 1851-1900 se encuentran presentes en dicha muestra;

- SEC ID nº 351-400, SEC ID nº 2201-2250; SEC ID nº 1701-1750, SEC ID nº 2601-2650, SEC ID nº 801-850, SEC ID nº 1251-1300, SEC ID nº 101-150, SEC ID nº 851-900, SEC ID nº 451-500, SEC ID nº 1801-1850 y SEC ID nº 1951-2000 se encuentran ausentes, y SEC ID nº 701-750 se encuentran presentes en dicha muestra;

- SEC ID nº 1601-1650, SEC ID nº 601-650; SEC ID nº 451-500, SEC ID nº 1351-1400, SEC ID nº 1751-1800, SEC ID nº 801-850, SEC ID nº 351-400, SEC ID nº 101-150, SEC ID nº 1051-1100, SEC ID nº 2601-2650, SEC ID nº 1701-1750, SEC ID nº 201-250 y SEC ID nº 1301-1350 se encuentran ausentes en dicha muestra, o;

- SEC ID nº 1601-1650, SEC ID nº 601-650; SEC ID nº 451-500, SEC ID nº 1351-1400, SEC ID nº 1751-1800, SEC ID nº 801-850, SEC ID nº 351-400, SEC ID nº 101-150, SEC ID nº 1051-1100, SEC ID nº 2601-2650, SEC ID nº 1701-1750, SEC ID nº 201-250 y SEC ID nº 1301-1350 se encuentran ausentes en dicha muestra, o;

- SEC ID nº 1501-1550, SEC ID nº 501-550; SEC ID nº 1201-1250, SEC ID nº 451-500, SEC ID nº 1701-1750, SEC ID nº 551-600, SEC ID nº 1351-1400, SEC ID nº 1801-1850, SEC ID nº 201-250, SEC ID nº 1601-1650, SEC ID nº 801-850, SEC ID nº 2501-2550, SEC ID nº 1301-1350 y SEC ID nº 1951-2000 se encuentran ausentes, y SEC ID nº 701-750 se encuentran presentes en dicha muestra;

- SEC ID nº 1601-1650, SEC ID nº 2501-2550, SEC ID nº 1301-1350, SEC ID nº 1501-1550, SEC ID nº 1101-1150, SEC ID nº 451-500, SEC ID nº 851-900, SEC ID nº 151-200, SEC ID nº 501-550, SEC ID nº 351-400, SEC ID nº 1001-1050, SEC ID nº 2201-2250, SEC ID nº 201-250 y SEC ID nº 801-850 se encuentran ausentes en dicha muestra, y SEC ID nº 701-750, SEC ID nº 1901-1950 y SEC ID nº 2751-2800 de la tabla 2 se encuentran presentes o;

- SEC ID nº 2201-2250, SEC ID nº 1301-1350, SEC ID nº 2301-2350, SEC ID nº 201-250, SEC ID nº 2501-2550, SEC ID nº 351-400, SEC ID nº 1251-1300, SEC ID nº 101-150, SEC ID nº 2601-2650, SEC ID nº 1801-1850, SEC ID nº 601-650, SEC ID nº 501-550, SEC ID nº 801-850, SEC ID nº 1101-1150, SEC ID nº 1-50 y SEC ID nº 1351-1400 se encuentran ausentes, y SEC ID nº 1851-1900 se encuentran presentes en dicha muestra;

- SEC ID nº 1501-1550, SEC ID nº 501-550, SEC ID nº 1601-1650, SEC ID nº 1351-1400, SEC ID nº 1751-1800, SEC ID nº 1001-1050, SEC ID nº 1051-1100, SEC ID nº 151-200, SEC ID nº 1801-1850, SEC ID nº 2201-2250, SEC ID nº 1301-1350, SEC ID nº 701-750, SEC ID nº 2501-2550, SEC ID nº 351-400 y SEC ID nº 801-850 se encuentran ausentes, y SEC ID nº 701-750, SEC ID nº 2401-2450, SEC ID nº 1851-1900 y SEC ID nº 2751-2800 se encuentran presentes en dicha muestra;

- SEC ID nº 851-900, SEC ID nº 2751-2800, 1351-1400, SEC ID nº 1751-1800, SEC ID nº 2201-2250, SEC ID nº 801-850, SEC ID nº 1701-1750, SEC ID nº 1601-1650, SEC ID nº 501-550, SEC ID nº 201-250, SEC ID nº 351-400, SEC ID nº 451-500, SEC ID nº 551-600, SEC ID nº 1201-1250 y SEC ID nº 1051-1110 se encuentran ausentes, y SEC ID nº 1901-1950, SEC ID nº 2401-2450, SEC ID nº 301-350, SEC ID nº 701-750 y SEC ID nº 2751-2800 se encuentran presentes en dicha muestra;

- SEC ID nº 2301-2350, SEC ID nº 201-250, SEC ID nº 1751-1800, SEC ID nº 1801-1850, SEC ID nº 1701-1750, SEC ID nº 2151-2200, SEC ID nº 501-550, SEC ID nº 351-400, SEC ID nº 801-850, SEC ID nº 1501-1550, SEC ID nº 851-900, SEC ID nº 601-650, SEC ID nº 1001-1050, SEC ID nº 2501-2550, SEC ID nº 151-200, SEC ID nº 1351-1400, SEC ID nº 2201-2250, SEC ID nº 1601-1650 y SEC ID nº 101-150 se encuentran ausentes, y SEC ID nº 701-750 se encuentran presentes en dicha muestra.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que comprende una etapa de detectar a partir de una muestra de ADN microbiano intestinal que ha sido obtenida de dicho sujeto si la totalidad de dichas 50 SEC ID nº 1-50 se encuentran ausentes en dicha muestra.

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que la presencia o la ausencia de los genes bacterianos se detecta mediante la utilización de una micromatriz nucleica.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por que la micromatriz nucleica es una micromatriz de oligonucleótidos que comprende por lo menos un oligonucleótido específico para por lo menos 50 genes bacterianos que presentan una secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 1-2.900.

9. Procedimiento para la evaluación *in vitro* del riesgo de desarrollar trastornos metabólicos, preferentemente diabetes de tipo II, síndrome hiperglucémico, enfermedades cardíacas, resistencia a la insulina o estasis hepática, que comprende las etapas de:

5

a) determinar si un sujeto presenta una diversidad bacteriana intestinal reducida con un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8; y

10

b) si dicho sujeto presenta una diversidad bacteriana intestinal reducida, evaluar que dicho sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar dichos trastornos metabólicos.

10. Procedimiento para la evaluación *in vitro* del riesgo de desarrollar trastornos inmunitarios, preferentemente sensibilidad a patógenos nosocomiales en personas de edad avanzada, asma alérgica en neonatos, dermatitis atópica o diabetes de tipo I en un sujeto, que comprende las etapas de:

15

a) determinar si un sujeto presenta una diversidad bacteriana intestinal reducida con un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8; y

20

b) si dicho sujeto presenta una diversidad bacteriana intestinal reducida, evaluar que dicho sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar dichos trastornos inmunitarios.

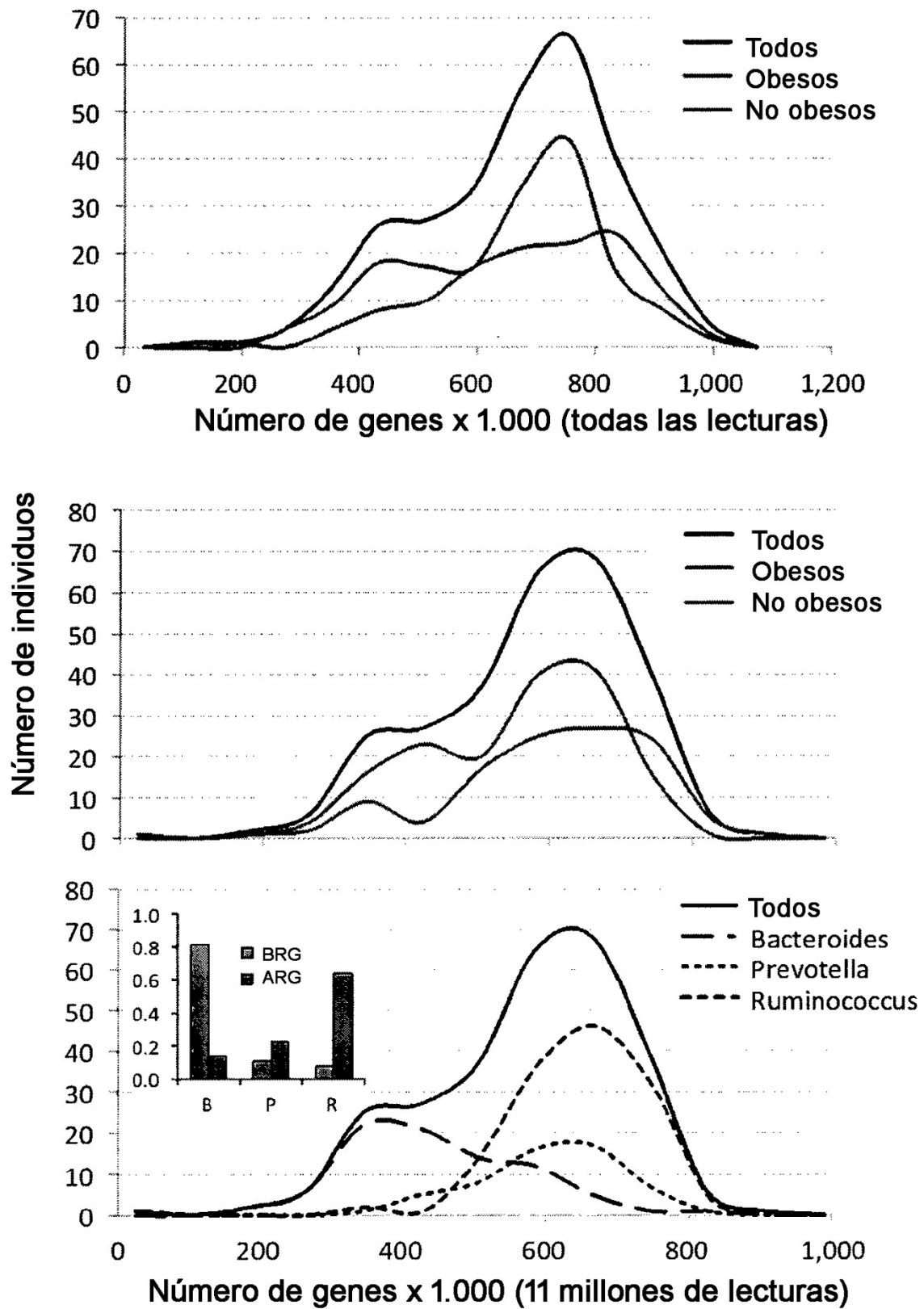
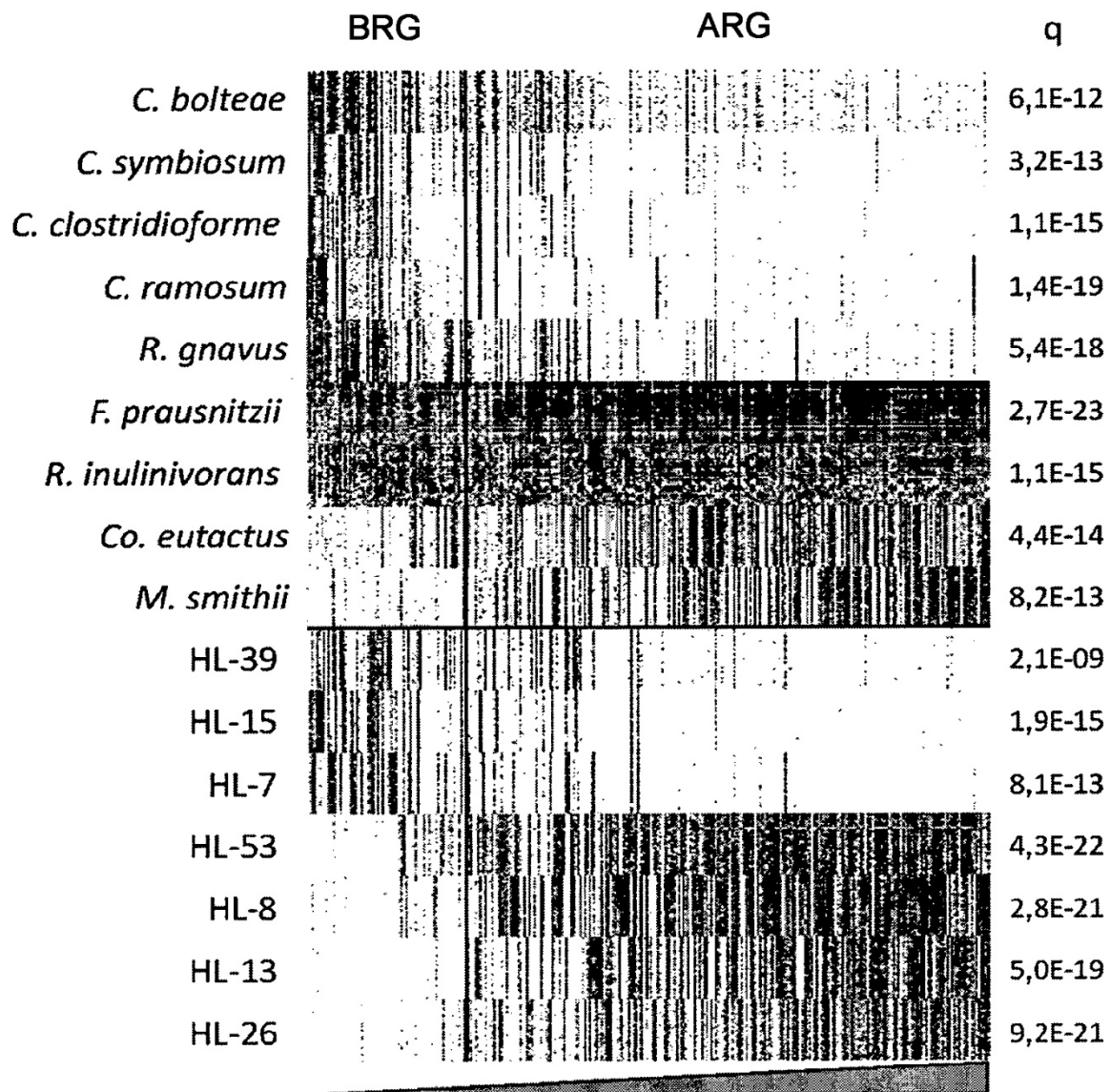


FIGURA 1



59.147 individuos según número de genes 878.816

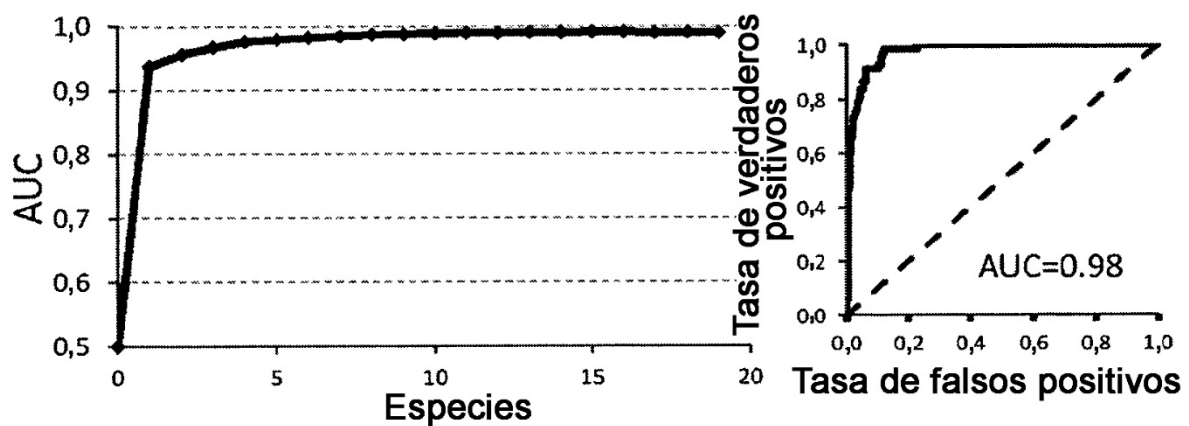


FIGURA 2

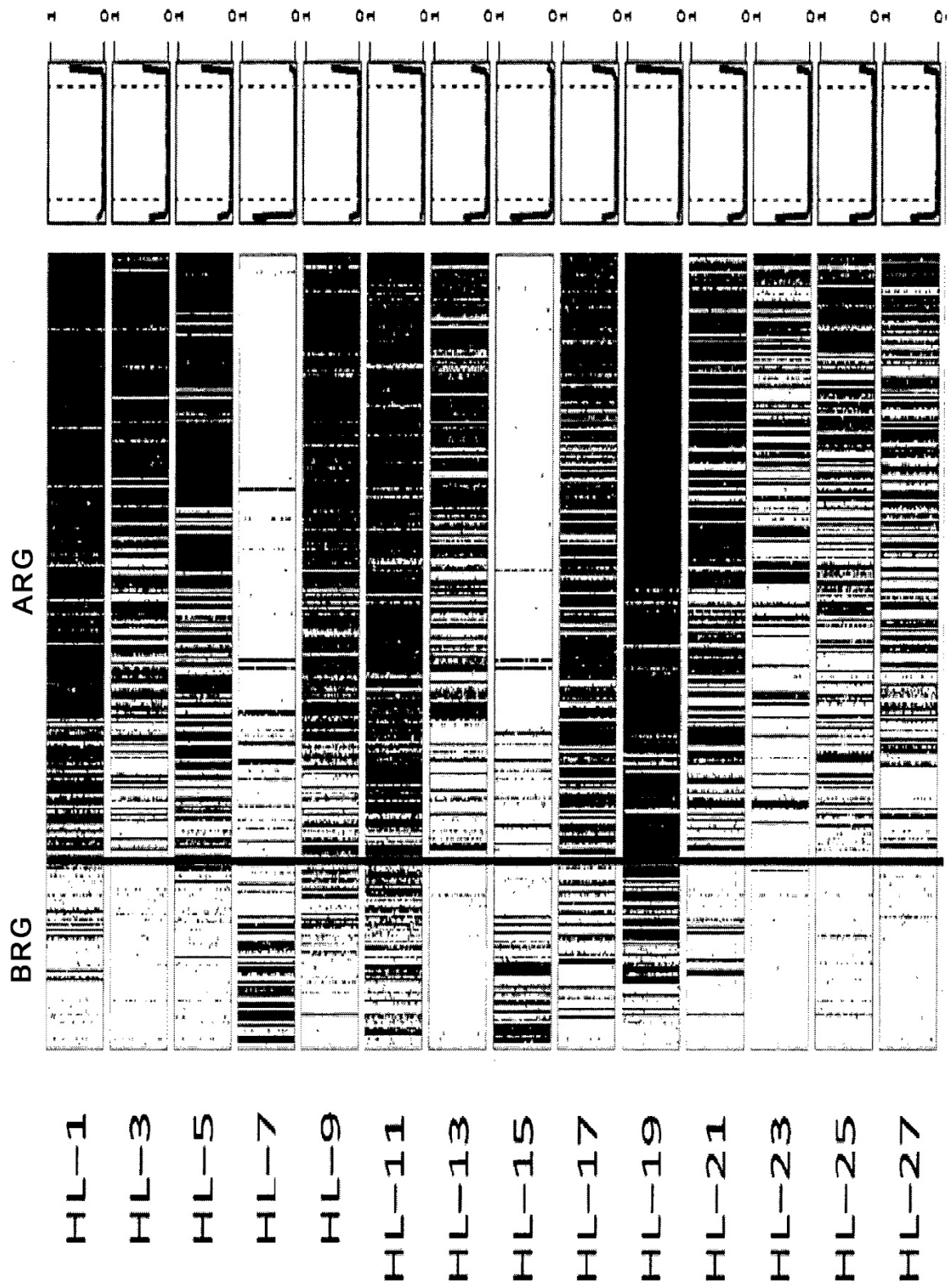


FIGURA 3

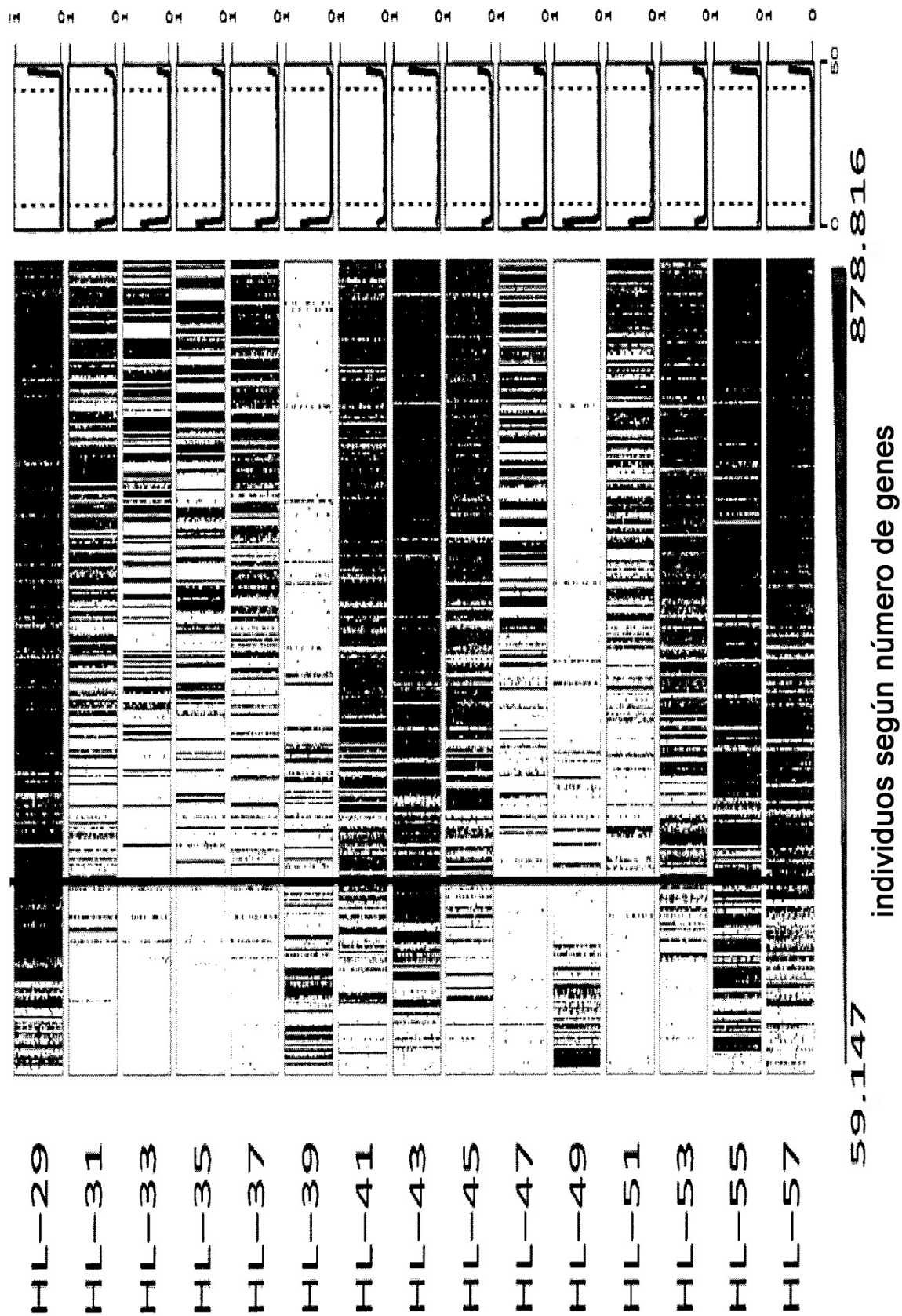


FIGURA 3 (continuación)

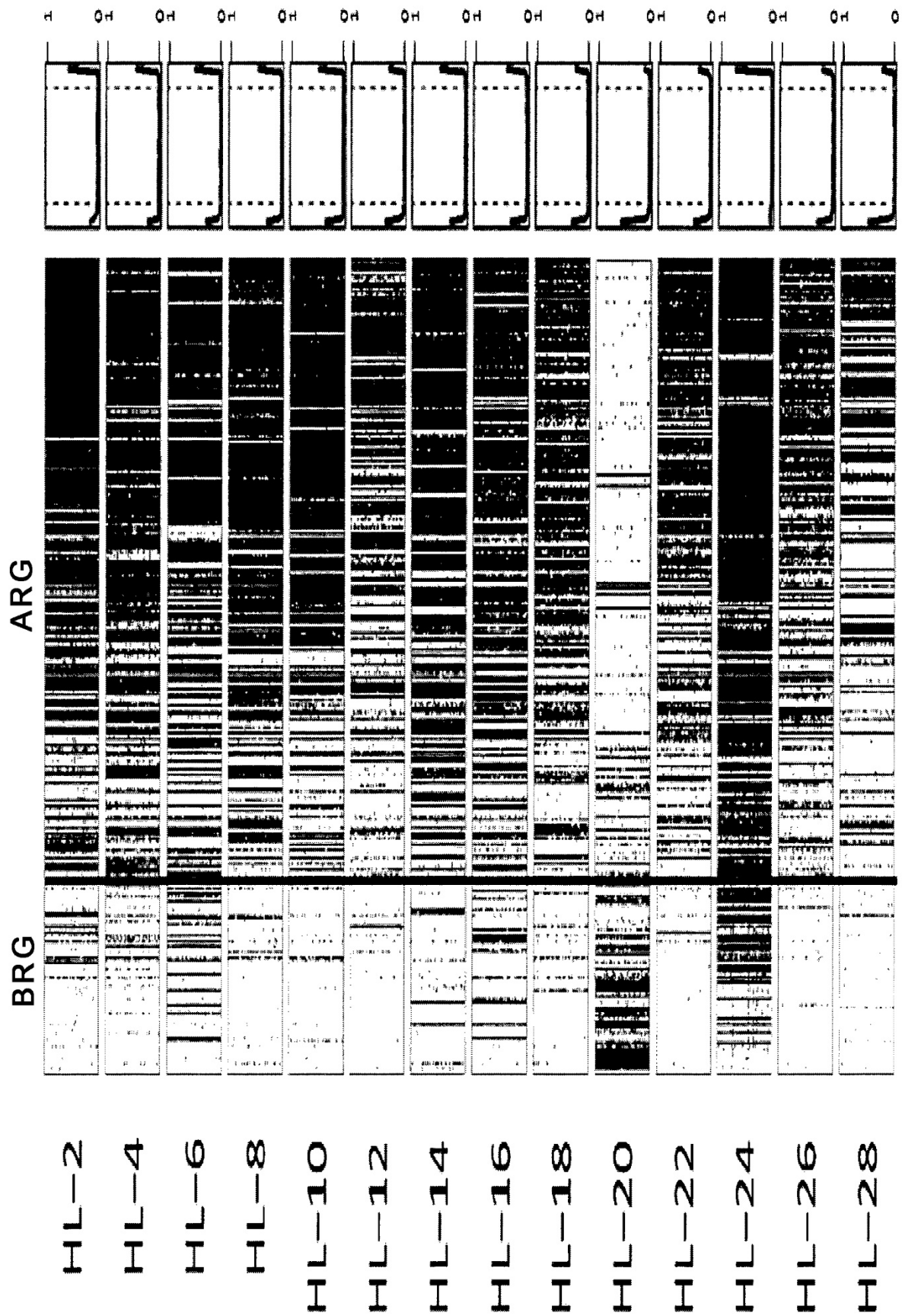
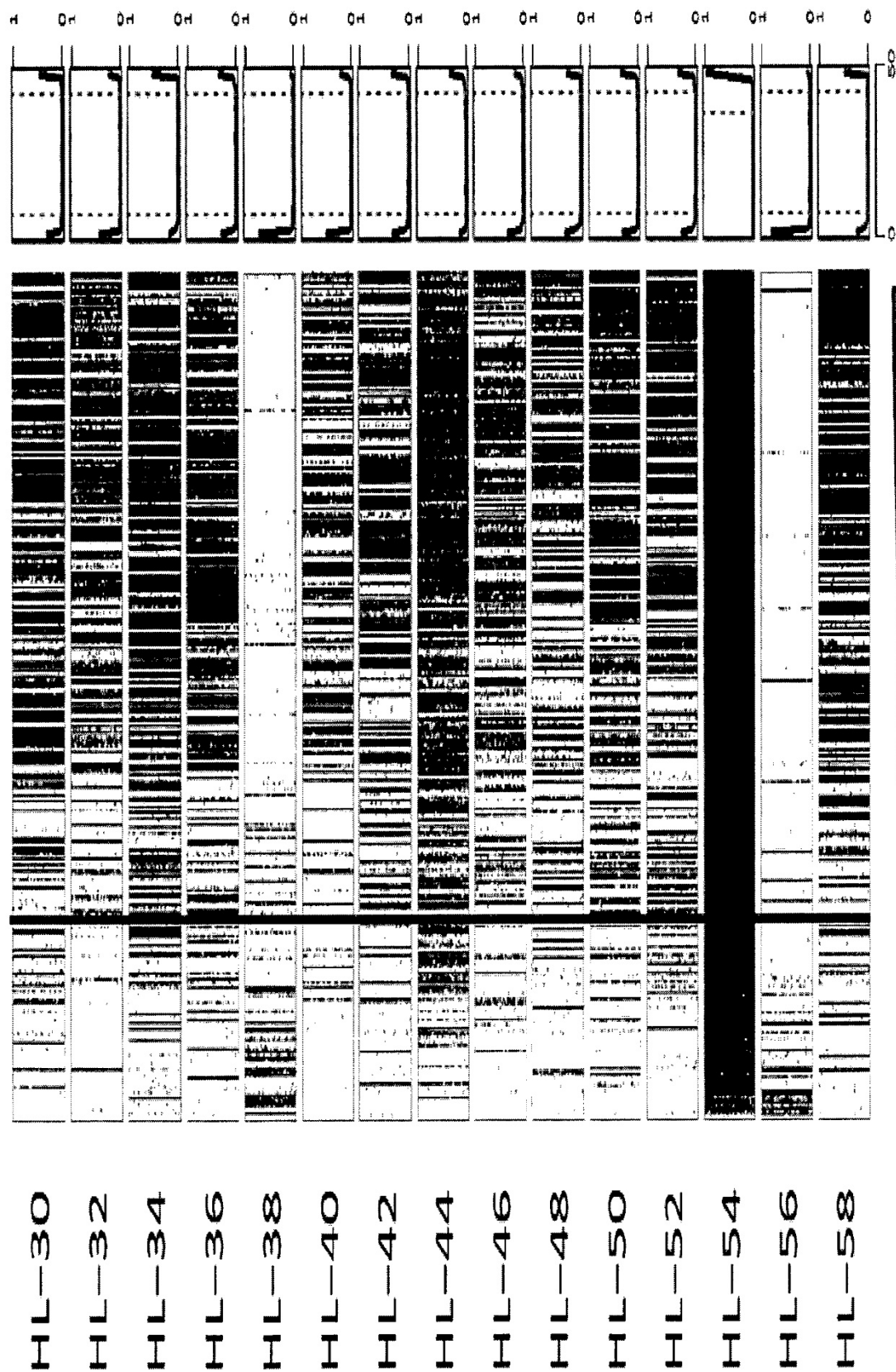


FIGURA 3 (continuación)



59.147 878.816
individuos según número de genes

FIGURA 3 (continuación)