

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 028 294**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2015 PCT/US2015/054655**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016 WO16057772**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2015 E 15849701 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2025 EP 3204771**

54 Título: **Métodos y sistemas para distinguir el síndrome del intestino irritable de la enteropatía inflamatoria y la enfermedad celíaca**

30 Prioridad:

09.10.2014 US 201462061877 P
01.12.2014 US 201462085825 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.06.2025

73 Titular/es:

CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER (100.00%)
8700 Beverly Boulevard
Los Angeles, CA 90048, US

72 Inventor/es:

PIMENTEL, MARK y
CHANG, CHRISTOPHER

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 3 028 294 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

Métodos y sistemas para distinguir el síndrome del intestino irritable de la enteropatía inflamatoria y la enfermedad celíaca

Esta invención se refiere al síndrome del intestino irritable predominante en diarrea (D-IBS), al diagnóstico y a la selección de tratamientos del mismo.

Antecedentes

El síndrome del intestino irritable (IBS) es la afección diagnosticada más comúnmente en gastroenterología con tasas de prevalencia notificadas de aproximadamente el 15% de la población. Durante los últimos 30 años, el diagnóstico del IBS se ha basado en criterios clínicos. Esto se debe a una mala comprensión de la patofisiología de esta afección.

Han surgido dos conceptos microbianos en la patogénesis del IBS. El primero sugiere que los síntomas del IBS parecen estar relacionados con alteraciones en la flora microbiana del intestino delgado. La evidencia de esto se basa en pruebas de aliento, cultivo del intestino delgado, secuenciación profunda de la flora del intestino delgado y la respuesta clínica al antibiótico específico para el intestino, rifaximina. El segundo concepto microbiano es que un subconjunto de sujetos desarrolla IBS después de un episodio de gastroenteritis aguda (AGE). Los metaanálisis de brotes clásicos sugieren que la tasa de desarrollo de IBS después de AGE es de aproximadamente el 10%.

El IBS es una afección que da como resultado cambios crónicos en la función intestinal incluyendo diarrea, estreñimiento y patrones alternos, así como síntomas abdominales incluyendo dolor y distensión abdominal. Debido a que los síntomas del IBS pueden solaparse con enfermedades orgánicas tales como la IBD y la enfermedad celíaca, el diagnóstico del IBS se realiza a menudo después de excluir enfermedades orgánicas. En una iniciativa multinacional reciente, los expertos en IBS acordaron que estos sujetos padecen cambios significativos en el hábito intestinal y distensión abdominal como síntomas principales. En ausencia de una patofisiología clara del IBS, la identificación de los sujetos se basa en un enfoque de "diagnóstico de exclusión". Este enfoque implica una gran cantidad de gastos y morbilidad para pacientes con IBS, particularmente aquellos con D-IBS, incluyendo diagnóstico por imagen corporal frecuente, endoscopia y análisis de sangre para descartar explicaciones orgánicas alternativas para sus síntomas.

Aunque los Criterios de Roma han sido valiosos en la normalización de la incorporación del IBS para ensayos clínicos, estos criterios siguen basándose en un enfoque de "diagnóstico de exclusión" ya que son inespecíficos. Por ejemplo, la mayoría de los sujetos con enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa cumplen los Criterios de Roma. Los Criterios de Roma II fueron adicionalmente útiles para definir el IBS basándose en el patrón predominante del intestino, tal como formas predominantes en diarrea y estreñimiento. Este enfoque condujo a fármacos en fase de desarrollo para el tratamiento del IBS basándose en el control de los síntomas en el IBS. Se han desarrollado procinética y secretagogos para C-IBS y anticinética para D-IBS. Sin embargo, estas terapias no se basan en el mecanismo causal del IBS y, en cambio, se basan en el control de síntomas. Como resultado, pueden dar como resultado la creación de síntomas opuestos.

Aunque el diagnóstico de la enfermedad celíaca se ha mejorado enormemente mediante la medición de la transglutaminasa tisular sérica, sigue existiendo la necesidad de biomarcadores que distingan el IBS de la IBD en el tratamiento de la diarrea crónica. Sigue existiendo la necesidad en la técnica de métodos, ensayos y sistemas para diagnosticar el IBS y distinguir el D-IBS de otras dolencias gastrointestinales tales como IBD y enfermedad celíaca.

Morales, W. et al. ("Antibodies to Cytolethal Distending Toxin B and Auto-Antibodies to Human Vinculin Are Elevated in IBS Subjects", GASTROENTEROLOGY vol. 144, nº 5, 1 de mayo de 2013 (2013-05-01), páginas S-914) divulga que los autoanticuerpos tanto anti-CdtB como antivinculina están elevados en suero de sujetos con síndrome de intestino irritable (IBS) y que no hay diferencia entre los subtipos de IBS IBS-C o IBS-D para ningún anticuerpo. El nivel de autoanticuerpos se mide mediante medición de densidad óptica en un formato de ensayo ELISA.

Virandera P. Bhalla et al. (2013) Gastroenterology Vol 144(5) página s914 divulga que los anticuerpos contra la toxina distensora citoletal B (CdtB) y los autoanticuerpos contra vinculina humana están elevados en sujetos con IBS.

El documento WO 2014/042828 divulga métodos para distinguir IBS de IBD en una muestra biológica usando mediciones de densidad óptica.

Compendio de la invención

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto.

5 La muestra biológica puede ser sangre completa, suero o plasma.

La detección en la muestra biológica puede comprender el uso de un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA). En diversas realizaciones, la detección en la muestra biológica puede comprender el uso de inmunohistoquímica, citometría de flujo, hibridación fluorescente *in situ* (FISH), radioinmunoensayos o purificación por afinidad.

Los anticuerpos antivinculina pueden ser capaces de unirse específicamente a un epítipo en vinculina o SEQ ID NO: 7.

15 Los anticuerpos anti-CdtB pueden ser capaces de unirse específicamente a un epítipo en CdtB de *Campylobacter jejuni* o SEQ ID NO: 5.

El diagnóstico del IBS puede realizarse si el nivel de anticuerpos antivinculina es mayor que el nivel de control establecido de anticuerpos antivinculina. En ciertas realizaciones, el diagnóstico de IBS puede realizarse si el nivel de anticuerpos anti-CdtB es mayor que el nivel de control establecido de anticuerpos anti-CdtB. En diversas realizaciones, el diagnóstico del IBS puede realizarse si tanto los niveles de anticuerpos antivinculina como de anticuerpos anti-CdtB son mayores que los niveles de control establecidos de anticuerpos antivinculina y anticuerpos anti-CdtB.

25 El nivel de control establecido de anticuerpos antivinculina, anticuerpos anti-CdtB o ambos puede ser una medición de la densidad óptica.

El nivel de control establecido de anticuerpos antivinculina, anticuerpos anti-CdtB o ambos puede ser una medición de la densidad óptica.

30 El diagnóstico del IBS puede realizarse si el nivel de anticuerpos antivinculina es mayor que el nivel de control establecido de anticuerpos antivinculina. En ciertas realizaciones, el diagnóstico del IBS puede realizarse si el nivel de anticuerpos anti-CdtB es mayor que el nivel de control establecido de anticuerpos anti-CdtB. En ciertas realizaciones, el diagnóstico del IBS puede realizarse si los niveles tanto de anticuerpos antivinculina como de anticuerpos anti-CdtB son mayores que los niveles de control establecidos de anticuerpos antivinculina y anticuerpos anti-CdtB.

40 Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, tomada junto con los dibujos adjuntos, que ilustran, a modo de ejemplo, diversas características de realizaciones de la invención.

Breve descripción de las figuras

45 En las figuras de referencia se ilustran realizaciones ejemplares. Se pretende que las realizaciones y figuras divulgadas en el presente documento se consideren ilustrativas en lugar de restrictivas.

La Figura 1A representa la comparación de la OD del anticuerpo anti-CdtB entre los grupos según diversas realizaciones de la presente invención.

50 La Figura 1B representa la comparación de la densidad óptica (OD) para el anticuerpo anti-CdtB entre los grupos. Los puntos representan sujetos atípicos más allá del gráfico de bigotes. Los valores cuantitativos eran mayores en sujetos con IBS en comparación con cualquier otro grupo ($p < 0,001$). Los valores cuantitativos eran mayores en sujetos con enfermedad celíaca en comparación con controles sanos y sujetos con IBD ($p < 0,001$).

55 La Figura 2A representa la comparación de la OD del anticuerpo antivinculina entre los grupos según diversas realizaciones de la presente invención.

60 La Figura 2B representa la comparación de la densidad óptica (OD) para el anticuerpo antivinculina entre los grupos. Los puntos representan sujetos atípicos más allá del gráfico de bigotes. Los valores cuantitativos eran mayores en sujetos con IBS en comparación con cualquier otro grupo ($p < 0,001$).

65 La Figura 3A representa la curva de rendimiento diagnóstico (ROC, de inglés "receiver operator curve") que compara los niveles de anti-CdtB y antivinculina entre sujetos con IBS y todos los sujetos sin IBS en el estudio según diversas realizaciones de la presente invención. (Anti-CdtB - línea superior; antivinculina - línea inferior).

La Figura 3B representa la curva de rendimiento diagnóstico (ROC) que compara los niveles de anti-CdtB y antivinculina entre sujetos con IBS y sujetos con IBD en el estudio. AUC, Superficie bajo la curva; CI, intervalo de confianza. (Anti-CdtB - línea superior; antivinculina - línea inferior).

5 La Figura 3C representa la curva de rendimiento diagnóstico (ROC) que compara los niveles de anti-CdtB y antivinculina entre sujetos con IBS y sujetos sanos en el estudio. (Anti-CdtB - línea superior; antivinculina - línea inferior).

10 La Figura 4 representa la curva de rendimiento diagnóstico (ROC) que compara los niveles de anti-CdtB y antivinculina entre sujetos con IBS y todos los sujetos con IBD en el estudio según diversas realizaciones de la presente invención. (Anti-CdtB - línea superior; antivinculina - línea inferior).

15 La Figura 5 representa la curva de rendimiento diagnóstico (ROC) que compara los niveles de anti-CdtB y antivinculina entre sujetos con IBS y celíacos. (Anti-CdtB - línea superior al principio; antivinculina - línea inferior al principio).

20 La Figura 6 representa la curva de rendimiento diagnóstico (ROC) que compara los niveles de anti-CdtB y antivinculina entre sujetos con IBS y sin IBS con diarrea crónica (es decir, CD, UC y enfermedad celíaca). (Anti-CdtB - línea superior; antivinculina - línea inferior).

La Figura 7 representa la curva de rendimiento diagnóstico (ROC) que compara los niveles de anti-CdtB y antivinculina entre sujetos con IBS y CD. (Anti-CdtB - línea superior; antivinculina - línea inferior).

25 La Figura 8 representa la curva de rendimiento diagnóstico (ROC) que compara los niveles de anti-CdtB y antivinculina entre sujetos con IBS y UC. (Anti-CdtB - línea superior; antivinculina - línea inferior).

Descripción de la invención

30 A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3ª ed., Revisada, J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2006); y Sambrook y Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 4ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2012) proporcionan al experto en la técnica una guía general para muchos de los términos usados en la presente solicitud. Para referencias sobre cómo preparar anticuerpos, véase D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual 2ª ed. (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor NY, 2013); Kohler y Milstein, (1976) Eur. J. Immunol. 6: 511; Queen et al. Patente de EE. UU. Nº 5.585.089; y Riechmann y col., Nature 332: 323 (1988); la Pat. EE. UU. Nº 4.946.778; Bird, Science 242:423-42 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); Ward et al., Nature 334:544-54 (1989); Tomlinson I. y Holliger P. (2000) Methods Enzymol, 326, 461-479; Holliger P. (2005) Nat. Biotechnol. Sep;23(9):1126-36).

Para los fines de la presente invención, se definen a continuación los siguientes términos.

45 "Mamífero", según se usa en el presente documento, se refiere a cualquier miembro de la clase Mammalia, incluyendo, sin limitación, seres humanos y primates no humanos tales como chimpancés, y otros homínidos y especies de monos; animales de granja tales como ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores tales como ratones, ratas y cobayas, y similares. El término no indica una edad o sexo particular. Por tanto, se pretende que los sujetos adultos y recién nacidos, así como los fetos, ya sean masculinos o femeninos, estén incluidos dentro del alcance de este término.

50 "Tratamiento" y "tratar", según se usa en el presente documento, se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas (p. ej., para reducir la probabilidad de tener la afección o estado de enfermedad), donde el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) la afección o trastorno patológico elegidos incluso si el tratamiento finalmente no tiene éxito. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen la afección o el trastorno, así como aquellos propensos a tener la afección o el trastorno o aquellos en los que se va a prevenir la afección o el trastorno (p. ej., reduciendo la probabilidad de tener la afección o el trastorno).

60 "Anticuerpo" o "anticuerpos", según se usan en el presente documento, incluyen anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, variantes de anticuerpos tales como Fv monocatenario (recombinante), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y fragmentos inmunológicamente activos de anticuerpos.

65 "Se une específicamente", según se usa en el presente documento, se refiere al acto de un anticuerpo que se une a su antígeno y pretende excluir una unión inespecífica de bajo nivel que pueda producirse entre proteínas aleatorias. "Se une específicamente", según se usa en el presente documento, no pretende y no implica que el

anticuerpo no se una a ninguna proteína distinta de las proteínas o polipéptidos que se divulgan en el presente documento ya que los anticuerpos pueden reaccionar de manera cruzada con cualquier proteína que incluya el epítipo pertinente.

5 "Significativamente mayor", según se usa en el presente documento en relación con las cantidades de referencia o control, se refiere a una cantidad estadísticamente significativa mayor que la cantidad de referencia o control.

10 Un modelo en animales recientemente validado de IBS posinfeccioso (PI-IBS) basado en la infección con *Campylobacter jejuni* sugiere que la AGE precipita el PI-IBS, conduciendo a alteraciones significativas en la colonización microbiana del intestino delgado. Usando este modelo, se determinó que el desarrollo de fenotipos de tipo IBS en estos animales era dependiente de una toxina específica, la toxina distensora citoletal B (CdtB). Significativamente, el desarrollo de fenotipos de tipo IBS en este modelo en animales se mitigaba en ausencia de CdtB. En una serie posterior de experimentos, los presentes inventores descubrieron que, a través de
15 mimetismo molecular, los anticuerpos del anfitrión contra CdtB reaccionan con la proteína del anfitrión vinculina en el aparato neuromuscular del intestino. La presencia de anticuerpos circulantes contra CdtB y vinculina en el modelo en animales está asociada con el desarrollo de poblaciones microbianas intestinales alteradas y cambios en el aparato neuromuscular intestinal, incluyendo reducciones significativas en el número de células intersticiales de Cajal (ICC) en el plexo muscular profundo.

20 Basándose en estos nuevos mecanismos patofisiológicos subyacentes al IBS, los presentes inventores evaluaron la prevalencia de anticuerpos anti-CdtB y antivinculina y CdtB en una gran cohorte de pacientes con IBS y controles sin IBS para validar biomarcadores para el IBS basándose en la detección de anticuerpos circulantes contra vinculina y CdtB en seres humanos.

25 En el presente documento, los presentes inventores describen un biomarcador para D-IBS basado en, sin desear limitarse a ninguna teoría específica, un mecanismo patofisiológico del IBS posinfeccioso y el posterior desarrollo de autoanticuerpos contra vinculina en el anfitrión. La prueba parece específica no solo para diagnosticar D-IBS, sino que, en el tratamiento de diarrea crónica, puede diferenciar sujetos con D-IBS de
30 aquellos con IBD.

Aunque la tasa de desarrollo de IBS después de una única gastroenteritis aguda es de aproximadamente el 10%, los datos de movilización militar y el modelado matemático sugieren que el IBS-PI podría explicar una gran parte del IBS en los EE. UU.. El PI-IBS se produce principalmente, aunque no exclusivamente, después
35 de infecciones bacterianas tales como *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *E. coli* y *Shigella*. Una toxina producida comúnmente por los cuatro organismos es la toxina distensora citoletal, un complejo heterotrímico de tres subunidades, CdtA, CdtB y CdtC, de las cuales CdtB es la subunidad activa.

40 Se ha mostrado que un modelo en animales validado desarrollado usando *C. jejuni* 81-176 exhibe un fenotipo de tipo IBS. Significativamente, estas ratas exhiben cambios en la forma de las heces, sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado (SIBO) y el aumento de linfocitos intraepiteliales rectales característico de seres humanos con IBS. En este modelo, los efectos parecían deberse a cambios en la neuroanatomía intestinal, con una reducción notable en las células intersticiales de Cajal. Además, ratas infectadas con una cepa mutante de *C. jejuni* que carece de CdtB exhibían un fenotipo de tipo IBS significativamente mitigado
45 en comparación con las infectadas con *C. jejuni* natural, sugiriendo que CdtB era importante en el desarrollo de IBS en este modelo. A través de una serie de experimentos inmunológicos en este modelo, se determinó que CdtB parecía no estar actuando simplemente a través de toxicidad directa sino más bien a través de la reacción cruzada de anticuerpos contra CdtB con la proteína del anfitrión vinculina. Los niveles de anticuerpos circulantes contra CdtB y vinculina se correlacionaron con el desarrollo y los niveles de SIBO en estos animales.

50 La vinculina es una proteína citoplásmica de unión a actina de 117 kDa que es un componente clave tanto de las adhesiones focales como de las uniones adherentes, que forman la conexión entre integrinas o cadherinas, respectivamente, y el citoesqueleto de actina. Por otra parte, la vinculina parece importante en la movilidad y contractilidad de las células neuronales y la formación cardíaca, como se evidencia por las anomalías del tubo neural, el miocardio y el endocardio en ratones con inactivación de vinculina, así como cardiomiopatía inducida por estrés en mutantes heterocigóticos. En un estudio publicado recientemente, se ha mostrado que Cdt de
55 *Helicobacter pullorum* se dirige a la vinculina en las células epiteliales intestinales, desencadenando una deslocalización atípica de vinculina desde las adherencias focales junto con una disminución de la adherencia celular. Otro estudio demostró que la vinculina es usada por la toxina IpA de *Shigella* para lograr la entrada de células.

60 Basándose en las observaciones patofisiológicas en este modelo en animales, los presentes inventores plantearon la hipótesis de que la exposición a CdtB conducía a inmunidad detectable a CdtB y autoinmunidad a vinculina basándose en mimetismo molecular. En este estudio, los presentes inventores evaluaron si los niveles de estos anticuerpos sirven como biomarcador para el D-IBS en seres humanos por primera vez usando un gran número de pacientes con IBS y sin IBS. Los presentes inventores observaron que los anticuerpos
65

plasmáticos contra vinculina y CdtB estaban elevados en D-IBS en comparación con controles sanos, sujetos con enfermedad celíaca y sujetos con IBD, de modo que los biomarcadores parecían ser capaces de distinguir D-IBS de todo lo diferente a IBS. Basándose en los valores cuantitativos de corte ideales, la prueba tiene una alta especificidad para identificar D-IBS en comparación con IBD. Puesto que la tTG es una prueba robusta para la enfermedad celíaca, en el tratamiento de la diarrea crónica, una necesidad real no satisfecha es un biomarcador que pudiera distinguir de manera fiable el IBS de la IBD. Cabe destacar que anti-CdtB, pero no antivinculina, también era elevado en la enfermedad celíaca. Otra necesidad no satisfecha significativa para la enfermedad celíaca es una prueba que distinga fácilmente los síntomas funcionales de la exposición continua al gluten. Los estudios sugieren que después de la exposición al gluten, el IBS es la segunda causa más común de enfermedad celíaca resistente al tratamiento y, por lo tanto, una prueba que pudiera distinguir entre estas causas de síntomas sería clínicamente útil.

Basándose en estos resultados, los anticuerpos anti-CdtB y antivinculina circulantes son biomarcadores para D-IBS y ofrecen algunas perspectivas únicas en la patofisiología del PI-IBS. Aunque sin desear limitarse a ninguna teoría particular, en primer lugar, estos son biomarcadores basados en un mecanismo para el desarrollo del IBS que puede implicar alteraciones en el sistema nervioso entérico y la movilidad intestinal. En segundo lugar, representan la primera oportunidad de hacer que el IBS sea un diagnóstico de inclusión en lugar de un "diagnóstico de exclusión". Puesto que no todos los sujetos con D-IBS dan positivo para estos biomarcadores, también es posible que estos anticuerpos identifiquen un subgrupo de IBS para el que se podrían desarrollar un mecanismo y terapias. Finalmente, sugiere que el IBS puede tener una base orgánica. Como biomarcador, las mediciones de anticuerpos antivinculina y anti-CdtB podrían ayudar a identificar D-IBS sin investigación excesiva y pueden ayudar a dirigir las investigaciones en aquellas en las que la prueba sea negativa.

Aunque la prueba tiene una menor especificidad para identificar D-IBS en comparación con la enfermedad celíaca, la prueba concomitante con anti-tTG debe compensar esto.

En conclusión, este estudio valida la presencia de antivinculina y anti-CdtB como biomarcadores sanguíneos que separan el D-IBS de la IBD y los controles sanos usando un ensayo multicéntrico prospectivo a gran escala. Los anticuerpos antivinculina y anti-CdtB también aparecen como parte de la patofisiología del IBS posinfeccioso y pueden identificar un subgrupo de D-IBS para terapias dirigidas. Lo más importante es que esto parece ser una etapa importante en la determinación de bases orgánicas para el IBS

Distinción del IBS de la IBD y la enfermedad celíaca

Diversas realizaciones de la presente invención proporcionan métodos para distinguir el IBS tanto de la IBD como de la enfermedad celíaca cuando el IBS es D-IBS.

El método puede comprender examinar una muestra biológica procedente de un sujeto que desea un diagnóstico para distinguir el IBS tanto de la IBD como de la enfermedad celíaca, detectar en la muestra biológica una presencia de anticuerpos antivinculina y anti-CdtB y hacer un diagnóstico de IBS si se detecta la presencia de anticuerpos antivinculina y anti-CdtB, o hacer un diagnóstico de IBD, sospecha de IBD, enfermedad celíaca o sospecha de enfermedad celíaca si hay ausencia de anticuerpos antivinculina y anti-CdtB. En ciertas realizaciones, el método comprende además analizar en la muestra biológica la presencia o ausencia de anticuerpos antivinculina y anti-CdtB. En ciertas realizaciones, el método comprende además seleccionar un tratamiento para el IBS si se diagnostica IBS, seleccionar un tratamiento para la IBD si se diagnostica o sospecha IBD, o seleccionar un tratamiento para la enfermedad celíaca si se diagnostica o sospecha enfermedad celíaca.

El método puede comprender examinar una muestra biológica procedente de un sujeto que desea un diagnóstico para distinguir el IBS tanto de la IBD como de la enfermedad celíaca, detectar en la muestra biológica un nivel de anticuerpos antivinculina y anti-CdtB, y hacer un diagnóstico del IBS si los niveles de anticuerpos antivinculina y anti-CdtB son significativamente mayores que un nivel de control establecido. En diversas realizaciones, los niveles de control establecidos son niveles de anticuerpos antivinculina y anti-CdtB dentro de dos desviaciones estándar de los niveles de anticuerpos antivinculina y anti-CdtB de sujetos sanos sin IBS, IBD, enfermedad celíaca o combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, el método comprende además analizar los niveles en muestras biológicas de anticuerpos antivinculina y anti-CdtB. En ciertas realizaciones, el método comprende además seleccionar un tratamiento del IBS si se diagnostica IBS.

El método puede comprender examinar una muestra biológica procedente de un sujeto que desea un diagnóstico para distinguir tanto IBS e IBD, detectar en la muestra biológica un nivel de anticuerpos antivinculina y anti-CdtB, y hacer un diagnóstico de IBS si el nivel de anticuerpos antivinculina y anti-CdtB es significativamente mayor que un nivel de control establecido. En diversas realizaciones, los niveles de control establecidos son niveles de anticuerpos antivinculina y anti-CdtB de sujetos sin IBS, IBD, enfermedad celíaca o combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, el método comprende además analizar en la muestra biológica los niveles de anticuerpos antivinculina y anti-CdtB. En ciertas realizaciones, el método comprende además seleccionar un tratamiento del IBS si se diagnostica IBS.

El ensayo es un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA), que incluye, pero no se limita a, ELISA indirecto, ELISA de tipo sándwich, ELISA competitivo, ELISA múltiple y portátil.

El ensayo comprende un primer reactivo para reaccionar con la muestra biológica si la muestra biológica comprende el anticuerpo antivinculina (si no están presentes anticuerpos antivinculina, entonces el primer reactivo no reaccionará con la muestra biológica, pero el primer reactivo todavía está presente en el ensayo), un segundo reactivo (p. ej., anticuerpo secundario) para reaccionar con el anticuerpo antivinculina o un segundo reactivo para reaccionar con el primer reactivo, y un sustrato. En diversas realizaciones, el primer reactivo es vinculina o un fragmento de la misma. En diversas realizaciones, el segundo reactivo comprende un marcador para producir una señal para indicar la presencia del anticuerpo antivinculina. En diversas realizaciones, el marcador es un radiomarcador, un cromóforo, un fluoróforo, un punto cuántico, una enzima, peroxidasa de rábano picante (HRP), una fosfatasa alcalina (AP), biotina o una combinación de los mismos. En diversas realizaciones, el marcador es una enzima que reaccionará con el sustrato. En diversas realizaciones, el primer reactivo está sobre una fase sólida (p. ej., una placa, una placa de múltiples pocillos).

El ensayo comprende un primer reactivo para reaccionar con el anticuerpo antivinculina. En diversas realizaciones, el primer reactivo comprende un marcador para producir una señal para indicar la presencia del anticuerpo antivinculina. En diversas realizaciones, el marcador es un radiomarcador, un cromóforo, un fluoróforo, un punto cuántico, una enzima, peroxidasa de rábano picante (HRP), una fosfatasa alcalina (AP), biotina o una combinación de los mismos. En diversas realizaciones, el reactivo está sobre una fase sólida (p. ej., una placa, una placa de múltiples pocillos).

Selección de tratamientos

La presente invención trata de un método para seleccionar un tratamiento para el D-IBS para un sujeto que lo necesite.

Seleccionar una terapia, según se usa en el presente documento, incluye, pero no se limita a, seleccionar, elegir, prescribir, aconsejar, recomendar, dar instrucciones o asesorar al sujeto con respecto al tratamiento.

La terapia seleccionada puede comprender administrar un ciclo de terapia antibiótica para tratar el D-IBS. En diversas realizaciones, la terapia es una terapia disponible en la técnica anterior.

En una realización preferida, el método comprende: detectar la presencia de anticuerpos antivinculina y anticuerpos anti-CdtB; y seleccionar un ciclo de terapia antibiótica para tratar el D-IBS.

Ejemplos de antibióticos que pueden seleccionarse para el tratamiento incluyen, pero no se limitan a, aminoglucósidos (p. ej., amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, estreptomina, tobramicina, paromomicina), ansamicinas (p. ej., geldanamicina, herbimicina), carbacefems (p. ej., loracarbef), carbapenems (p. ej., ertapenem, doripenem, imipenem, cilastatina, meropenem), cefalosporinas (p. ej., primera generación: cefadroxilo, cefazolina, cefalotina, cefalexina; segunda generación: cefaclor, cefamandol, cefoxitina, cefprozilo, cefuroxima; tercera generación: cefixima, cefdinir, cefditoreno, cefoperazona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, ceftibuteno, ceftizoxima, ceftriaxona; cuarta generación: cefepima; quinta generación: ceftobiprol), glucopéptidos (p. ej., teicoplanina, vancomicina), macrólidos (p. ej., azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, telitromicina, espectinomicina), monobactams (p. ej., aztreonam), penicilinas (p. ej., amoxicilina, ampicilina, azlocilina, carbenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, mezlocilina, meticilina, nafcilina, oxacilina, penicilina, piperacilina, ticarcilina), polipéptidos antibióticos (p. ej., bacitracina, colistina, polimixina b), quinolonas (p. ej., ciprofloxacina, enoxacina, gatifloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, ofloxacina, trovafloxacina), rifamicinas (p. ej., rifampina, rifabutina, rifapentina, rifaximina), sulfonamidas (p. ej., mafenida, prontosil, sulfacetamida, sulfametizol, sulfanilamida, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprim, trimetoprim-sulfametoxazol (cotrimoxazol, "tmp-smx") y tetraciclinas (p. ej., demeclociclina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina), así como arsfenamina, cloranfenicol, clindamicina, lincomicina, etambutol, fosfomicina, ácido fusídico, furazolidona, isoniazida, linezolid, metronidazol, mupirocina, nitrofurantoína, platensimicina, pirazinamida, una combinación de quinupristina/dalfopristina, y tinidazol, o una combinación de los mismos. Los antibióticos seleccionados pueden ser una combinación de rifaximina y neomicina; una combinación de rifaximina y doxiciclina; o una combinación de rifaximina y metronidazol.

Los antibióticos seleccionados son preferiblemente antibióticos no absorbibles. Ejemplos de antibióticos no absorbibles incluyen, pero no se limitan a, rifaximina, neomicina, bacitracina, vancomicina, teicoplanina, ramoplanina y paramomicina.

Densidad óptica como medida de los niveles de anticuerpos

En ciertas realizaciones, se usa la densidad óptica (OD) para medir el nivel de anticuerpos antivinculina y/o anticuerpos anti-CDT. Por ejemplo, la densidad óptica sirve como nivel de control establecido en diversas

realizaciones. En ciertas realizaciones, cuando la OD de los anticuerpos antivinculina (OD_v) es mayor que 1,62, 1,86 o 2,23, se determina que el sujeto tiene IBS. En diversas realizaciones, cuando la OD de los anticuerpos antivinculina (OD_v) es mayor que 1,00, 1,25, 1,50, 1,75, 2,00, 2,25, 2,50, 2,75, se determina que el sujeto tiene IBS. En ciertas realizaciones, estos números de OD se basan en una dilución de la muestra biológica de 1:32 y una concentración de antígeno de 1,2 µg/ml.

En ciertas realizaciones, cuando la OD de los anticuerpos anti-CDT (OD_{CDT}) es mayor que 2,48 o 2,79, se determina que el sujeto tiene IBS. En diversas realizaciones, cuando la OD de los anticuerpos anti-CDT (OD_{CDT}) es mayor que 2,00, 2,25, 2,50, 2,75, 3,00, se determina que el sujeto tiene IBS. En ciertas realizaciones, estos números de OD se basan en una dilución de la muestra biológica de 1:512 y una concentración de antígeno de 1,2 µg/ml.

En otras realizaciones, los puntos de corte de la OD_v y la OD_{CDT} pueden determinarse basándose en diferentes diluciones de la muestra biológica y los antígenos y se incluyen dentro de las realizaciones de la presente invención.

En realizaciones adicionales, las determinaciones anteriores pueden usarse para dirigir el tratamiento para el sujeto. En una realización, un sujeto con la presencia probable de IBS o una probabilidad de tener IBS puede tratarse con una o más terapias para el IBS.

Un experto en la técnica podrá seleccionar un tratamiento disponible para el IBS basándose en el diagnóstico del IBS. Por ejemplo, antibióticos tales como rifaximina y neomicina pueden usarse para tratar el IBS. Particularmente, la rifaximina se puede usar para tratar el IBS con diarrea predominante, y una combinación de rifaximina/neomicina se puede usar para tratar el IBS con estreñimiento predominante.

Anticuerpos antivinculina

El anticuerpo antivinculina detectado según la invención es un anticuerpo que se une específicamente a vinculina.

En diversas realizaciones, el anticuerpo antivinculina es un anticuerpo que se une específicamente a un péptido de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos que tiene al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología con 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos contiguos de vinculina.

En otra realización, el anticuerpo antivinculina se une específicamente a un polipéptido que comprende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos que tiene al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología con 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos contiguos de vinculina.

En otra realización, el anticuerpo antivinculina se une específicamente a un polipéptido que comprende o consiste en 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos contiguos de vinculina.

El anticuerpo antivinculina puede ser un anticuerpo que se une específicamente a SEQ ID NO: 7.

El anticuerpo antivinculina puede ser un anticuerpo que se une específicamente a un péptido de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos que tiene al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología con 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos contiguos de SEQ ID NO: 7.

En otra realización, el anticuerpo antivinculina se une específicamente a un polipéptido que comprende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos que tiene al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología con 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos contiguos de SEQ ID NO: 7.

En otra realización, el anticuerpo antivinculina se une específicamente a un polipéptido que comprende o consiste en 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos contiguos de SEQ ID NO: 7.

Los residuos contiguos de vinculina o SEQ ID NO: 7 incluyen aquellos que comienzan en cualquier aminoácido y terminan en cualquier aminoácido de vinculina o SEQ ID NO: 7.

Secuencia proteica de la vinculina (SEQ ID NO: 7):

MPVFHTRTIESILEPVAQQISHLVIMHEEGEVDGKAIPDLTAPVAAVQAAVSNLVRVG
KETVQTTEDQILKRDMPPAFIKVENACTKL VQAAQMLQSDPYSPARDYLIDGSRGI
LSGTSLLLLTFDEAEVRKIIRVCKGILEYLTVAEVVETMEDLVTYTKNLGPGMTKMA
KMIDERQQELTHQEHRVMLVNSMNTVKELLPVLISAMKIFVTTKNSKNQGIEEALKN
RNFTVEKMSAEINEIRVLQLTSWDEDAWASKDTEAMKRALASIDSKLNQAKGWLR
DPSASPGDAGEQAIRQILDEAGKVGELCAGKERREILGTCKMLGQMTDQVADLRAR
GQGSSPVAMQKAQQVSQGLDVLTA KVENAARKLEAMTNSKQSIKKIDAAQNWLA
DPNGGPEGEEQIRGALAEARKIAELCDDPKERDDILRSLGEISALTSKLADLRRQKGK
DSPEARALAKQVATALQNLQTKTNRAVANSRPAKAAVHLEGKIEQAQRWIDNPTV
DDRGVGQAAIRGLVAEGHRLANVMMGPYRQDLLAKCDRVDQLTAQLADLAARGE
GESPQARALASQLQDSLKDLKARMQEAMTQEVSDVFSDTTTPIKLLAVAATAPPDA
PNREEVFDERAANFENHSGKLGATAEKAAA VGTANKSTVEGIQASVKTARELTPQV
VSAARILLRNPGNQAAAYEHFETMKNQWIDNVEKMTGLVDEAIDTKSLLDASEEAIK
KDLDKCKVAMANIQQPQMLVAGATSIARRANRILLVAKREVENSEDPKFREAVKAAS
DELSKTISPMVMDAKAVAGNISDPGLQKSFLDSGYRILGAVAKVREAFQPQEPDFPPP
PPDLEQLRLTDELAPPKPPLPEGEVPPPRPPPEEKDEEFPEQKAGEVINQPMMAAR
QLHDEARKWSSKGNDIIAAKRMALLMAEMSRLVRGGSGTKRALIQC AKDIAKASD
EVTRLAKEVAKQCTDKRIRTNLLQVCERIPTISTQLKILSTVKATMLGRTNISDEESEQ
ATEMLVHNAQNLMQSVKETVREAEAASIKIRTDAGFTLRWVRKTPWYQ

- 5 En diversas realizaciones, la detección de la presencia o ausencia del anticuerpo se realiza en una muestra biológica obtenida del sujeto. En otra realización, la detección de la presencia o ausencia del anticuerpo se realiza en una muestra de sangre, suero o heces obtenida del sujeto. Un experto en la técnica apreciará fácilmente métodos y sistemas que pueden usarse para detectar la presencia o ausencia de un anticuerpo que se une específicamente a vinculina, SEQ ID NO: 7, o un fragmento de la misma. Estos métodos y sistemas
- 10 incluyen, pero no se limitan a, ELISA, inmunohistoquímica, citometría de flujo, hibridación fluorescente *in situ* (FISH), radioinmunoanálisis y purificación por afinidad.

- En diversas realizaciones, la vinculina, SEQ ID NO: 7, o un fragmento de la misma (como se ha descrito anteriormente) se usa como sustrato o reactivo (p. ej., colector, trampa) para unirse a anticuerpos antivinculina (si están presentes).
- 15

- En ciertas realizaciones, la detección de la presencia o ausencia de un anticuerpo que se une específicamente a vinculina, SEQ ID NO: 7, o un fragmento de la misma puede realizarse poniendo en contacto vinculina, SEQ ID NO: 7, o un fragmento de la misma con una muestra biológica obtenida del sujeto para aislar el anticuerpo que se une específicamente a vinculina, SEQ ID NO: 7, o un fragmento de la misma, donde el aislamiento del anticuerpo que se une específicamente a vinculina, SEQ ID NO: 7, o un fragmento de la misma indica la presencia del anticuerpo y la falta de aislamiento del anticuerpo que se une específicamente a vinculina, SEQ ID NO: 7, o un fragmento de la misma indica la falta del anticuerpo. En diversas realizaciones, el fragmento de vinculina o SEQ ID NO: 7 pueden ser los fragmentos que se describen en el presente documento. Como
- 20 ejemplo, una matriz de afinidad que comprende vinculina, SEQ ID NO: 7, o un fragmento de la misma puede unirse a un soporte sólido; la muestra biológica puede ponerse en contacto con la matriz de afinidad para producir un complejo de matriz de afinidad-anticuerpo (si el anticuerpo está presente); el complejo de matriz de afinidad-anticuerpo puede separarse del residuo de la muestra biológica; y el anticuerpo puede liberarse de la matriz de afinidad. En otro ejemplo, un marcador (p. ej., un marcador fluorescente) puede colocarse sobre
- 25 vinculina, SEQ ID NO: 7, o un fragmento de la misma; la vinculina, SEQ ID NO: 7, marcada o un fragmento de la misma marcado puede ponerse en contacto con una muestra biológica para permitir que el anticuerpo (si está presente) se una específicamente a la vinculina, SEQ ID NO: 7, marcada o un fragmento de la misma marcado. En diversas realizaciones, la vinculina, SEQ ID NO: 7, marcada o un fragmento de la misma marcado puede separarse y analizarse su unión al anticuerpo.
- 30
- 35

Anticuerpos anti-CdtB

El anticuerpo anti-CdtB usado según la invención es un anticuerpo que se une específicamente a la subunidad CdtB de CDT. Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de CdtB es la toxina distensora citoletal B de *Campylobacter jejuni*, que tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5). Otro ejemplo de una secuencia de aminoácidos de CdtB es la toxina distensora citoletal B de *Campylobacter coli*, que tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 2).

SEQ ID NO: 5:

MKKIICLFLSFNLAFFANLENFNVGTWNLQGSSAATESKWSVSVRQLVSGANPLDILM
IQEAGTLPRATPTGRHVQQGGTPIDEYEWNLGTLSPDRVFIYYSRVDVGANRVNL
AIVSRMQAEEVIVLPPPTTVSRPIIGIRNGNDAFFNIHALANGGTDVGAITAVDAHFA
NMPQVNWMIAGDFNRDPSTITSTVDRELANRIRVVFPTSATQASGGTLDYAITGNSN
RQQTYTPPLLAAILMLASLRSHIVSDHFPVNFRRF

SEQ ID NO: 1:

MKKIVFLILSFNVLF AALENYNTGTWNLQGSSAATESKWNVSIRQLITGANPMDVLA
VQEAGVLPSTAMMTPRQVQPVGVGPIHEIYIWNLGSVSRPSSVYIYYSRVDVGANRV
NLAIVSRVQADEVFVLPPTVASRPIIGIRIGNDAFFNIHALASGGNDAGAIVA AAVDMF
FRNRPDINWMILGDFNRESGALVTLDPDLRARTRVVPPSSSTQTSGRITIDYAITGNS
NTAALYNPPPIVAILALEGLRTFLASDHFPVNFRRP

SEQ ID NO: 2:

atgaaaaaa tagtattttt gattttaagt ttaattgtat tatttgccgc ttagaaaaat 60
tacaacaccg gaacttgga tttgcaaggc tcatcagctg caactgaaag caaatggaat 120
gttagtataa gacaactcat aaccggtgca aatcctatgg atgttttagc tgttcaagaa 180
gcggggggtt tacctagtag agctatgatg actcctagac aggtacaacc cgtgggcgtg 240
ggtattccta tacatgaata catatggaat tiaggctctg tatcaagacc tagctctgtt 300
tatatatatt attctagagt gtagttagga gcaaatcgtg tgaatttagc taltgttagc 360
agagtgaag cggatgaagt tttgtttta cccctccaa cagtgtctc aagacctatt 420
ataggcatac gcataggcaa ttagtctttt ttcaatatac acgtctagc aagtggggga 480
aatgacgcag gagccattgt cgtgctgtg gatattttt ttgaaatag acctgatatt 540
aattggatga ttttaggcga ttttaataga gaacaggcg ccttagtaac ctgctagat 600
cctgacttaa gagcacgcac tcgcgtagt gttccgcctt cttctacgca aacaagtga 660
agaacgattg attatgctat cactggaaat tccaacactg cagctttata caaccacca 720
ccgatagttg cgatttttagc tttagaagga ttaagaacct tttggcttc agatcatttt 780
cctgtaaatt ttagaagacc ttag 804

Se prefiere que el anticuerpo se una específicamente a SEQ ID NO: 5 (CdtB de *C. jejuni*). En diversas realizaciones, el anticuerpo anti-CdtB es un anticuerpo que se une específicamente a una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a SEQ ID NO: 5.

En otra realización, el anticuerpo anti-CdtB es un anticuerpo que se une específicamente a SEQ ID NO: 1 (CdtB de *C. coli*). En diversas realizaciones, el anticuerpo anti-CdtB es un anticuerpo que se une específicamente a una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a SEQ ID NO: 1.

En otra realización, el anticuerpo anti-CdtB es un anticuerpo que se une específicamente a un péptido de 17

residuos de CdtB (p. ej., 17 residuos de SEQ. ID NO: 1 o 5). En una realización, el péptido de 17 residuos tiene la siguiente secuencia: LDYAITGNSNRQQTYTP (SEQ ID NO: 3).

5 En otras realizaciones, el anticuerpo anti-CdtB es un anticuerpo que se une específicamente a un péptido de 17 residuos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología con 17 residuos contiguos de CdtB (p. ej., 17 residuos contiguos de SEQ. ID NO: 1 o 5). En una realización, los 17 residuos de CdtB tienen la siguiente secuencia: LDYAITGNSNRQQTYTP (SEQ ID NO: 3).

10 En otras realizaciones, el anticuerpo anti-CdtB es un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que comprende 17 residuos que tienen al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología con 17 residuos contiguos de CdtB (p. ej., 17 residuos de SEQ. ID NO: 1 o 5). En una realización, los 17 residuos contiguos de CdtB tienen la siguiente secuencia: LDYAITGNSNRQQTYTP (SEQ ID NO: 3).

15 En otra realización, el anticuerpo anti-CdtB es un anticuerpo que se une específicamente a un péptido de 18 residuos que tiene la siguiente secuencia: CLDYAITGNSNRQQTYTP (SEQ ID NO 4). La cisteína en el extremo N se añadió a SEQ ID NO: 3 con fines de conjugación.

20 En otras realizaciones, el anticuerpo anti-CdtB es un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que comprende 18 residuos que tienen al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología con CLDYAITGNSNRQQTYTP (SEQ ID NO: 4).

25 En otra realización, el anticuerpo anti-CdtB es un anticuerpo que se une específicamente a un péptido de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología con 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos contiguos de CdtB (p. ej., 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos contiguos de SEQ ID NO: 1 o 5). En otra realización, el anticuerpo anti-CdtB es un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que comprende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología con 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos contiguos de CdtB (p. ej., 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos contiguos de SEQ ID NO: 1 o 5). Los residuos contiguos de SEQ ID NO: 1 incluyen los que comienzan en cualquier aminoácido y terminan en cualquier aminoácido de SEQ ID NO: 1. Los residuos contiguos de SEQ ID NO: 5 incluyen los que comienzan en cualquier aminoácido y terminan en cualquier aminoácido de SEQ ID NO: 5.

35 En otra realización, el anticuerpo anti-CdtB es un anticuerpo que se une específicamente a un péptido de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 residuos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología con 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 residuos contiguos de LDYAITGNSNRQQTYTP (SEQ ID NO: 3) (p. ej., 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 residuos contiguos de SEQ ID NO: 3). En otra realización, el anticuerpo purificado se une específicamente a un polipéptido que comprende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 residuos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de homología con 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 residuos contiguos de SEQ ID NO: 3 (p. ej., 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 residuos contiguos de SEQ ID NO: 3). Los residuos contiguos de SEQ ID NO: 3 incluyen los que comienzan en cualquier aminoácido y terminan en cualquier aminoácido de SEQ ID NO: 3.

45 En otra realización, el anticuerpo anti-CdtB es un anticuerpo que se une específicamente a un péptido de 17 residuos codificado por la secuencia génica de CdtB. En realizaciones particulares, el anticuerpo anti-CdtB es un anticuerpo que se une específicamente a un péptido de 17 residuos codificado por SEQ ID NO: 2. En diversas realizaciones, el anticuerpo anti-CdtB es un anticuerpo que se une específicamente a un péptido de 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos codificado por SEQ ID NO: 2. En diversas realizaciones, el anticuerpo purificado se une específicamente a un péptido de 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología con 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos contiguos codificados por SEQ ID NO: 2. En diversas realizaciones, el anticuerpo anti-CdtB es un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que comprende 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos que tienen al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología con 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 residuos contiguos codificados por SEQ ID NO: 2.

60 En otra realización, el anticuerpo anti-CdtB es un anticuerpo que se une específicamente a un péptido codificado por la secuencia de ácido nucleico que tiene la siguiente secuencia: CTTGATTATGCAATTACAGGAAATTCAAATAGACAACAAACCTATACTCCA (SEQ ID NO: 6), que codifica el péptido de 17 aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En otra realización, el anticuerpo anti-CdtB es un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que comprende un péptido codificado por SEQ ID NO: 6.

65 En otra realización, el anticuerpo anti-CdtB es un anticuerpo que se une específicamente a CdtB purificada a partir de *E. coli* que sobreexpresa un ORF de CdtB de longitud casi completa. (Véase *Infection and Immunity*, diciembre de 2000, pág. 6535-6541, Vol. 68, N° 12, incorporado en su totalidad como referencia como si se

expusiera completamente).

En diversas realizaciones, cuando se determina la presencia o el nivel de anticuerpos antivinculina, la proteína vinculina o un fragmento de la misma según se describe en el presente documento se usa como antígeno a una concentración de aproximadamente 1,2 µg/ml. En otras realizaciones, la concentración puede ser una concentración de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o 2,0 µg/ml. En diversas realizaciones, se usa una dilución de aproximadamente 1:32 de la muestra biológica (p. ej., plasma) en la determinación de la presencia o el nivel de anticuerpos antivinculina. En otras realizaciones, se usa una dilución de aproximadamente 1:8, 1:10, 1:12, 1:16, 1:20, 1:24, 1:30, 1:36, 1:48 o 1:64 de la muestra biológica (p. ej., plasma) en la determinación de la presencia o el nivel de anticuerpos antivinculina. En otras realizaciones, se usa una dilución de aproximadamente 1:8 a 1:64 de la muestra biológica (p. ej., plasma) en la determinación de la presencia o el nivel de anticuerpos antivinculina.

En diversas realizaciones, cuando se determina la presencia o el nivel de anticuerpos anti-CdtB, la proteína CdtB o un fragmento de la misma según se describe en el presente documento se usa como antígeno a una concentración de aproximadamente 1,2 µg/ml. En otras realizaciones, la concentración puede ser una concentración de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o 2,0 µg/ml. En diversas realizaciones, se usa una dilución 1:512 de la muestra biológica (p. ej., plasma) en la determinación de la presencia o el nivel de anticuerpos anti-CdtB. En otras realizaciones, se usa una dilución de aproximadamente 1:128, 1:256, 1:768 o 1:1024 de la muestra biológica (p. ej., plasma) en la determinación de la presencia o el nivel de anticuerpos anti-CdtB. En otras realizaciones, se usa una dilución de aproximadamente 1:100, 1:150, 1:200, 1:250, 1:300, 1:350, 1:400, 1:500, 1:550, 1:600, 1:650, 1:700, 1:750, 1:800, 1:850, 1:900, 1:950 o 1:1000 de la muestra biológica (p. ej., plasma) en la determinación de la presencia o el nivel de anticuerpos anti-CdtB. En otras realizaciones, se usa una dilución de aproximadamente 1:100 - 1:1000 de la muestra biológica (p. ej., plasma) en la determinación de la presencia o el nivel de anticuerpos anti-CdtB.

Los antígenos se inmovilizan durante aproximadamente 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 horas (p. ej., durante la noche, >16 horas) a aproximadamente 4°C en placas de alta capacidad de unión (p. ej., placas de 96 pocillos) en solución salina tamponada con borato (BBS) a un pH de 8,2. Los pocillos, alternamente, se revisten con antígeno o se dejan sin revestir en BBS para permitir la determinación de la unión inespecífica de plasma. Los pocillos se bloquean con seroalbúmina bovina aproximadamente al 3% en 1xPBS durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente temperatura ambiente. Los pocillos revestidos y no revestidos se incuban a continuación con una dilución 1:512 de plasma para CdtB y una dilución 1:32 de plasma para vinculina durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos contra CdtB y vinculina se usan como controles positivos. Esto fue seguido por aproximadamente 1 hora de incubación con anticuerpos secundarios conjugados a HRP. Cada etapa es seguida por una serie de lavados usando PBS-Tween 20 al 0,05%. Finalmente, se usa una solución de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) para la visualización y se lee inmediatamente en un lector de placas (p. ej., BioTek Synergy HT; Winooski, VT). Las densidades ópticas (OD) se leen durante aproximadamente 90 minutos a 370 nm y se usan para comparar los niveles de anti-CdtB o antivinculina. Se usaron valores de OD brutos para el análisis de datos.

Tipos de IBS

El IBS puede presentarse como IBS con estreñimiento predominante (C-IBS), IBS con diarrea predominante (D-IBS), IBS alternante (A-IBS) (más recientemente renombrado mixto (M-IBS)), o síndrome del intestino irritable posinfeccioso (PI-IBS).

Ejemplos de síntomas de IBS incluyen, pero no se limitan a diarrea, estreñimiento, tensión abdominal y dolor abdominal.

Muestras biológicas

Ejemplos de muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a, líquidos corporales, sangre completa, plasma, heces, líquidos o aspirados intestinales y líquidos o aspirados estomacales, suero, líquido cefalorraquídeo (LCR), orina, sudor, saliva, lágrimas, secreciones pulmonares, aspirado mamario, líquido prostático, líquido seminal, raspado cervicouterino, líquido amniótico, líquido intraocular, moco y humedad en el aliento. En realizaciones particulares del método, la muestra biológica puede ser sangre completa, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, heces, líquido o aspirado intestinal o líquido o aspirado estomacal. En diversas realizaciones, la muestra biológica puede ser sangre completa. En diversas realizaciones, la muestra biológica puede ser suero. En diversas realizaciones, la muestra biológica puede ser plasma.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor la invención reivindicada y no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención. En la medida en que se mencionen materiales específicos, es meramente con fines ilustrativos y no pretende limitar la invención. Un experto en la técnica puede desarrollar

medios o reaccionantes equivalentes sin el ejercicio de la capacidad de invención y sin apartarse del alcance de la invención.

Ejemplo 1 - Materiales y métodos

Grupos de sujetos

Para la validación de este marcador sérico, se incorporaron sujetos de un ensayo terapéutico controlado aleatorizado a gran escala de 180 centros en IBS con diarrea predominante (D-IBS) (DIANA 3). Los sujetos con D-IBS se seleccionaron basándose en la presencia de los Criterios de Roma III. Se incorporaron 6 controles sanos del Cedars-Sinai Medical Center y del Beth Israel Deaconess Medical Center. Todos los controles sanos se cribaron con respecto a antecedentes de enfermedad gastrointestinal y a síntomas gastrointestinales activos basándose en los antecedentes y la finalización de un cuestionario de síntomas intestinales. Se incorporaron sujetos con enteropatía inflamatoria (IBD) y enfermedad celíaca basándose en la presencia de dolencias intestinales y la confirmación histológica de cambios inflamatorios crónicos en el colon o el intestino delgado coherentes con enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa (UC) o enfermedad celíaca.

Los sujetos eran excluidos del estudio si tenían antecedentes de diabetes, VIH, enfermedad tiroidea inestable y uso crónico de narcóticos. Para sujetos con IBS y controles sanos, también era un criterio de exclusión la cirugía intestinal (excluyendo la colestectomía o apendectomía).

Datos de los pacientes

Se obtuvieron los datos demográficos de los pacientes para todos los sujetos incluyendo edad y género. En el caso de la IBD, el tipo de enfermedad (UC o enfermedad de Crohn).

Recogida de plasma

Se recogió plasma de todos los sujetos. Este se recogió mediante venopunción en un tubo de tapón violeta, se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos y a continuación se almacenó congelado a -80°C hasta el momento de la prueba. En el caso de los sujetos con D-IBS del OBJETIVO 3, el plasma se recogió antes del tratamiento en el ensayo.

Ensayo ELISA

Se realizaron ELISA usando bien una proteína de CdtB de *Campylobacter* recombinante completa (Creative Biomart, Shirley, NY) o bien la proteína vinculina de longitud completa (Novoprotein, Short Hills, NJ) como antígenos a una concentración de 1,2 µg/ml. Los antígenos se inmovilizaron durante la noche a 4°C sobre placas de 96 pocillos de alta capacidad de unión (Grenier Bio-One, Monroe, NC) en solución salina tamponada con borato (BBS) (Medicago, Uppsala, Suecia) a un pH de 8,2. Los pocillos, alternamente, se revistieron con antígeno o se dejaron sin revestir en BBS para permitir la determinación de la unión inespecífica del plasma. Los pocillos se bloquearon con seroalbúmina bovina al 3% en 1xPBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos revestidos y no revestidos se incubaron a continuación con una dilución 1:512 de plasma para CdtB y una dilución 1:32 de plasma para vinculina durante 1 hora a temperatura ambiente. Se usaron anticuerpos contra CdtB y vinculina como controles positivos. Esto fue seguido por una incubación de 1 hora con anticuerpos secundarios conjugados a HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Cada etapa fue seguida por una serie de lavados usando PBS-Tween 20 al 0,05%. Finalmente, se usó una solución de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (Pierce, Rockford, IL) para la visualización y se leyó inmediatamente en un lector de placas BioTek Synergy HT (Winooski, VT). Las densidades ópticas (OD) se leyeron durante 90 minutos a 370 nm y se usaron para comparar los niveles de anti-CdtB o antivinculina. Se usaron valores de OD brutos para el análisis de datos.

Análisis estadístico (datos sin pacientes celíacos)

Los datos se expresaron como media \pm error estándar (SE) e intervalos de confianza (CI) del 95% exactos. Se realizaron comparaciones de múltiples grupos usando análisis unidireccional de varianza (ANOVA) después de confirmar la igualdad de varianzas mediante la prueba de Bartlett. La normalidad de la distribución de datos se evaluó usando histogramas con curvas solapadas de densidad de Kernel y de distribuciones normales. La distribución de antivinculina y anti-CdtB se normalizó después de que los valores se transformaran en raíces cuadradas y cuadrados respectivamente. Se usó la prueba de la t de Student para comparaciones de variables distribuidas normalmente entre dos grupos. Se usó la prueba de la χ^2 de Pearson para la comparación de los datos categóricos. Se construyeron curvas de rendimiento diagnóstico (ROC) usando metodología no paramétrica. Los intervalos de confianza para las superficies bajo las curvas (AUC) se calcularon usando el método de DeLong. Se calcularon la sensibilidad, especificidad y razón de probabilidad de cada valor independiente de antivinculina y anti-CdtB hasta una precisión de 0,01 OD y se evaluaron para capturar los valores de corte. Un valor de P de $<0,05$ se consideraba significativo. El análisis se realizó usando STATA

versión 11.2 (STATA Corp., Texas, EE. UU. de A.)

Análisis estadístico (datos con pacientes celíacos)

- 5 Las variables numéricas se resumieron por la media \pm desviación estándar. La normalidad de las distribuciones de datos se evaluó usando histogramas con curvas solapadas de densidad de Kernel y distribuciones normales. La distribución de antivinculina se normalizó mediante una transformación de raíz cuadrada. La homogeneidad de la varianza se evaluó mediante el ensayo de Bartlett.
- 10 Se usó la prueba de la t de Student para comparaciones de variables distribuidas normalmente entre dos grupos. Las variables distribuidas normalmente se compararon entre más de dos grupos mediante ANOVA unidireccional y pruebas *a posteriori* de Dunnett con IBS como grupo de referencia. Las variables categóricas se resumieron por frecuencia y porcentaje. Se usó la prueba de la χ^2 de Pearson para la comparación de los datos categóricos. Se construyeron curvas de rendimiento diagnóstico (ROC) de manera estándar. Los
- 15 intervalos de confianza para las superficies bajo las curvas (AUC) se computaron usando el método de DeLong et al. 21. Se calcularon la sensibilidad, especificidad y razón de probabilidad de antivinculina y anti-CdtB hasta una precisión de 0,01 OD y se evaluaron para obtener los valores de corte favorables. Se usó en todo momento el nivel de significación de 0,05. El análisis estadístico se realizó usando STATA versión 11.2 (STATA Corp., Texas, EE. UU. de A.) y SAS versión 9.3 (SAS Institute, Cary, Carolina del Norte, EE. UU. de A.).
- 20

Ejemplo 1 - Resultados

Datos demográficos de los pacientes (sin análisis relativo a pacientes celíacos)

- 25 En total, se incorporaron 2767 sujetos (Tabla 1A). Esto incluía 2564 sujetos con D-IBS, 43 sujetos sanos, 10 sujetos celíacos y 150 con IBD (n = 78 con enfermedad de Crohn, 72 con colitis ulcerosa (UC)). Había significativamente más mujeres en las cohortes de voluntarios sanos, con IBS y enfermedad celíaca en comparación con la cohorte de IBD (P=0,01). Los sujetos con IBS tenían un promedio de 6,7 años más que los sujetos sin IBS (P<0,01). La edad no era significativamente diferente entre los otros grupos.
- 30

Tabla 1A: Datos demográficos de los pacientes.

	Número de sujetos	Edad	% de mujeres
Controles sanos	43	36,0 \pm 9,9	67,4
IBS	2564	46,4 \pm 13,6	68,2
CD	78	41,8 \pm 13,1	56,4
UC	72	40,2 \pm 12,9	55,5
IBD (UC+CD)	150	41,0 \pm 13,0	56,0
Enfermedad celíaca	10	35,6 \pm 10,3	70
Los valores se dan como media \pm DE; OD - densidad óptica; CD - enfermedad de Crohn, UC - colitis ulcerosa			

Datos demográficos de los pacientes (con análisis relativo a pacientes celíacos)

- 35 En total, se incorporaron 2681 sujetos (Tabla 1B). Esto incluía 2375 sujetos con D-IBS, 43 sujetos sanos, 121 sujetos celíacos y 142 con IBD (n=73 con enfermedad de Crohn, n=69 con colitis ulcerosa). Los sujetos con IBS tenían un promedio de 3,9 años más que los grupos sin IBS (p<0,001). No había diferencias en la distribución por sexos de los sujetos con IBS y sin IBS; sin embargo, el porcentaje de mujeres era mayor en
- 40 los controles sanos, los grupos con IBS y enfermedad celíaca en comparación con el grupo con IBD (P<0,001).

Tabla 1B: Datos demográficos de los pacientes.

	Número de sujetos	Edad (intervalo)	% de mujeres
Controles sanos	43	36,0 \pm 9,9 (22-62)	67,4
D-IBS	2375	44,4 \pm 12,2 (18-65)	67,6
CD	73	40,6 \pm 11,3 (18-65)	56,2
UC	69	41,2 \pm 12,2 (19-63)	55,1
IBD (UC+CD)	142	40,9 \pm 11,7 (18-65)	55,6

	Número de sujetos	Edad (intervalo)	% de mujeres
Enfermedad celíaca	121	41,6±12,3 (19-65)	76
Los valores se dan como media ± desviación estándar, CD - enfermedad de Crohn, UC - colitis ulcerosa.			

Comparaciones por ELISA entre grupos (sin pacientes celíacos)

Los niveles de anti-CdtB en sujetos con IBS eran significativamente mayores que en todos los sujetos sin IBS ($2,54 \pm 0,01$ (CI del 95% 2,52-2,57) en comparación con $1,68 \pm 0,05$ (CI del 95% 1,58-1,79)) ($P < 0,001$) (Figura 1A). No había diferencias significativas en los niveles de anti-CdtB entre sujetos sin IBS (prueba de la F $P = 0,25$).

Los niveles de antivinculina eran significativamente mayores en sujetos con IBS en comparación con todos los sujetos sin IBS ($1,3334 \pm 0,02$ (CI del 95% 1,30-1,37) en comparación con $1,01 \pm 0,06$ (CI del 95% 0,89-1,12)) ($P < 0,001$) (Figura 2A). Las diferencias en los niveles de antivinculina entre sujetos sin IBS no eran estadísticamente significativas (prueba de la F $P = 0,08$).

Comparaciones por ELISA entre grupos (con pacientes celíacos)

Usando los niveles de densidad óptica, los niveles de anticuerpos anti-CdtB en sujetos con D-IBS ($2,53 \pm 0,69$) eran significativamente mayores que en sujetos sanos ($1,81 \pm 0,73$), enfermedad de Crohn ($1,72 \pm 0,81$), colitis ulcerosa ($1,54 \pm 0,68$) y enfermedad celíaca ($2,23 \pm 0,70$) ($P < 0,001$) (Figura 1B). No había diferencias en los niveles de anti-CdtB entre sujetos sanos y sujetos con IBD ($p = 0,23$); sin embargo, los sujetos con enfermedad celíaca tenían niveles de anti-CdtB mayores que todos los demás grupos sin IBS ($p < 0,001$).

Los niveles de antivinculina también eran significativamente mayores en sujetos con D-IBS ($1,34 \pm 0,85$) en comparación con sujetos sanos ($0,81 \pm 0,59$), enfermedad de Crohn ($1,05 \pm 0,91$), colitis ulcerosa ($0,96 \pm 0,77$) y enfermedad celíaca ($1,07 \pm 0,98$) ($P < 0,0001$) (Figura 1B). Las diferencias en los niveles de antivinculina entre sujetos sin IBS no eran estadísticamente significativas.

Análisis de sensibilidad y especificidad (sin pacientes celíacos)

Se usaron curvas de rendimiento diagnóstico (ROC) para evaluar la utilidad de los niveles de antivinculina y anti-CdtB en la diferenciación de sujetos con IBS de sujetos sin IBS, individuos con IBD y sanos. Las Figuras 3A y 4 muestran las curvas ROC para estas dos pruebas cuando se comparan sujetos con IBS con todos los sujetos sin IBS y con sujetos con IBD, respectivamente. La prueba anti-CdtB funcionaba mejor que la antivinculina y parecía discriminar igualmente el IBS de todos los sujetos sin IBS y del grupo con IBD solo. En el análisis de subgrupos, parecía no haber diferencia basada en el tipo de IBD (datos no mostrados). La curva ROC tanto para anti-CdtB como para antivinculina muestra que el D-IBS puede discriminarse de sujetos sanos basándose en esta prueba.

Los niveles de densidad óptica (OD) para cada prueba se usaron a continuación para determinar el umbral ideal para la identificación de D-IBS. Las Tablas 2A y 3A muestran algunos umbrales potenciales de densidad óptica para la identificación del IBS basándose en la sensibilidad, especificidad y razón de probabilidad. Para D-IBS, es más deseable una mayor especificidad incluso cuando se asocia con una menor sensibilidad. En el D-IBS, una prueba ideal diagnosticaría definitivamente el IBS, reduciendo así la necesidad de pruebas invasivas. Por lo tanto, la especificidad y la razón de probabilidad se consideraron más importantes. Basándose en las curvas ROC, el nivel ideal para anti-CdtB parecía ser un nivel de $\geq 2,48$ y para antivinculina el nivel óptimo era de $\geq 1,62$, lo que parece optimizar la especificidad con efectos relativamente limitados sobre la sensibilidad.

Tabla 2A: Valores de corte favorables de anti-CdtB para el diagnóstico del IBS sobre otras causas

OD	% de especificidad	% de sensibilidad	+LR	-LR
$\geq 2,48$	84,7	60,7	4,0	0,5
$\geq 2,79$	91,1	44,4	5,0	0,6
OD - densidad óptica, +LR - razón de probabilidad positiva, -LR - razón de probabilidad negativa				

Tabla 3A: Valores de corte favorables de antivinculina para el diagnóstico del IBS sobre otras causas

OD	% de especificidad	% de sensibilidad	+LR	-LR
≥1,62	82,3	35,0	2,0	0,78
≥1,86	86,7	26,5	2,0	0,8
≥2,23	92,1	15,7	2,0	0,9

OD - densidad óptica, +LR - razón de probabilidad positiva, -LR - razón de probabilidad negativa

Análisis de sensibilidad y especificidad (con pacientes celíacos)

Se usó el rendimiento diagnóstico (ROC) para evaluar la utilidad de los niveles de antivinculina y anti-CdtB en la diferenciación de sujetos con D-IBS de sujetos con IBD. La Figura 3B muestra las curvas ROC para estas dos pruebas cuando se comparan sujetos con D-IBS con sujetos con IBD. Aunque ambas pruebas eran eficaces para discriminar sujetos con D-IBS del grupo con IBD, la superficie bajo la curva (AUC) para el diagnóstico de D-IBS frente a IBD era mayor para anti-CdtB que para antivinculina (0,81 y 0,62, respectivamente). En el análisis de subgrupos, parecía no haber diferencia basada en el tipo de IBD (datos no mostrados). Las curvas ROC para D-IBS en comparación con sujetos sin IBS, celíacos y controles sanos también eran discriminatorias.

Los niveles de densidad óptica (OD) para cada prueba se usaron a continuación para determinar el umbral ideal para la identificación de D-IBS en comparación con IBD. Las Tablas 2B y 3B muestran algunos umbrales potenciales de densidad óptica para la identificación de D-IBS basándose en la sensibilidad, especificidad y razón de probabilidad. Una prueba ideal diagnosticaría definitivamente el IBS, reduciendo así la necesidad de pruebas invasivas. Por lo tanto, los presentes inventores se centraron en la especificidad y la razón de probabilidad positiva. Basándose en esto, el umbral ideal para anti-CdtB para identificar D-IBS parecía ser ≥ 2,80, mientras que para antivinculina el umbral óptimo parecía ser ≥ 1,68.

Tabla 2B: Valores de corte favorables para anti-CdtB para el diagnóstico de D-IBS sobre IBD

OD	% de especificidad	% de sensibilidad	+LR	-LR
≥2,49	85,9	60,0	4,3	0,5
≥2,80	91,6	43,7	5,2	0,6
≥3,04	95,8	28,3	6,7	0,7

OD - densidad óptica, +LR - razón de probabilidad positiva, -LR - razón de probabilidad negativa

Tabla 3B: Valores de corte favorables para antivinculina para el diagnóstico de D-IBS sobre IBD

OD	% de especificidad	% de sensibilidad	+LR	-LR
≥1,53	80,3	37,8	1,9	0,8
≥1,68	83,8	32,6	2,0	0,8
≥1,80	84,5	28,9	1,8	0,8

OD - densidad óptica, +LR - razón de probabilidad positiva, -LR - razón de probabilidad negativa

Efecto del sexo sobre el biomarcador (sin pacientes celíacos)

Los niveles de anti-CdtB y antivinculina también se compararon en mujeres solamente y en hombres solamente. A pesar de las diferencias de sexo entre sujetos con D-IBS y grupos de control, ambos biomarcadores podrían usarse para identificar con éxito D-IBS tanto en hombres como en mujeres.

Los encabezamientos usados en el presente documento son simplemente para organización y no pretenden limitar la divulgación de ninguna manera. El contenido de cualquier sección individual puede ser igualmente aplicable a todas las secciones.

Diversas realizaciones de la invención se han descrito anteriormente en la Descripción detallada. Aunque estas descripciones describen directamente las realizaciones anteriores, se entiende que los expertos en la técnica pueden concebir modificaciones y/o variaciones a las realizaciones específicas mostradas y descritas en el presente documento. Se pretende que cualquiera de estas modificaciones o variaciones que se encuentre

dentro de la esfera de esta descripción también esté incluida en la misma. A menos que se indique específicamente, la intención de los inventores es que a las palabras y expresiones en la memoria descriptiva y las reivindicaciones se les den los significados habituales y acostumbrados para los expertos en la técnica o las técnicas aplicables.

- 5
- La descripción anterior de diversas realizaciones de la invención conocidas por el solicitante en este momento de presentación de la solicitud se ha presentado y está destinada a fines de ilustración y descripción. La presente descripción no pretende ser exhaustiva ni limitar la invención a la forma precisa divulgada y son posibles muchas modificaciones y variaciones a la luz de las enseñanzas anteriores. Las realizaciones
- 10 descritas sirven para explicar los principios de la invención y su aplicación práctica y para permitir que otros expertos en la técnica utilicen la invención en diversas realizaciones y con diversas modificaciones que sean adecuadas para el uso particular contemplado. Por lo tanto, se pretende que la invención no esté limitada a las realizaciones particulares divulgadas para llevar a cabo la invención.
- 15 Los expertos en la técnica entenderán que, en general, los términos usados en el presente documento se entienden generalmente como términos "abiertos" (p. ej., el término "que incluye" debe interpretarse como "que incluye, pero no se limita a", el término "que tiene" debe interpretarse como "que tiene al menos", el término "incluye" debe interpretarse como "incluye pero no se limita a", etc.).

REIVINDICACIONES

1. Un método para distinguir el síndrome del intestino irritable predominante en diarrea (D-IBS) tanto de la enteropatía inflamatoria (IBD) como de la enfermedad celíaca, que comprende:

examinar una muestra biológica que se ha obtenido de un sujeto que desea un diagnóstico para distinguir el D-IBS tanto de la IBD como de la enfermedad celíaca;

detectar en la muestra biológica niveles de anticuerpos antivinculina y anti-toxina distensora citoletal B (CdtB); y

realizar un diagnóstico de D-IBS si el nivel de anticuerpos antivinculina es significativamente mayor que un nivel de control de anticuerpos antivinculina procedente de individuos sanos, el nivel de anticuerpos anti-CdtB es significativamente mayor que un nivel de control de anticuerpos anti-CdtB procedente de individuos sanos, o tanto los niveles de anticuerpos antivinculina como de anticuerpos anti-CdtB son significativamente mayores que el nivel de control de anticuerpos antivinculina y anticuerpos anti-CdtB procedente de individuos sanos.

2. El método según la reivindicación 1, donde el diagnóstico de D-IBS se realiza si el nivel de anticuerpos antivinculina es significativamente mayor que el nivel de control de anticuerpos antivinculina procedente de individuos sanos.

3. El método según la reivindicación 1, donde el diagnóstico de D-IBS se realiza si el nivel de anticuerpos anti-CdtB es significativamente mayor que el nivel de control de anticuerpos anti-CdtB procedente de individuos sanos.

4. El método según la reivindicación 1, donde el diagnóstico de D-IBS se realiza si tanto los niveles de anticuerpos antivinculina como de anticuerpos anti-CdtB son significativamente mayores que los niveles de control de anticuerpos antivinculina y anticuerpos anti-CdtB procedentes de individuos sanos.

5. El método según la reivindicación 1, donde el nivel de control de anticuerpos antivinculina, anticuerpos anti-CdtB o ambos procedente de individuos sanos es una medición de la densidad óptica.

6. Un método para seleccionar un tratamiento para el síndrome del intestino irritable predominante en diarrea (D-IBS), la enteropatía inflamatoria (IBD) o la enfermedad celíaca, que comprende:

examinar una muestra biológica que se ha obtenido de un sujeto que desea un diagnóstico para distinguir el D-IBS tanto de la IBD como de la enfermedad celíaca;

detectar en la muestra biológica niveles de anticuerpos antivinculina y anti-toxina distensora citoletal B (CdtB);

realizar un diagnóstico de D-IBS si el nivel de anticuerpos antivinculina es significativamente mayor que un nivel de control de anticuerpos antivinculina procedente de individuos sanos, el nivel de anticuerpos anti-CdtB es significativamente mayor que un nivel de control de anticuerpos anti-CdtB procedente de individuos sanos o tanto los niveles de anticuerpos antivinculina y como de anticuerpos anti-CdtB son significativamente mayores que los niveles de control de anticuerpos antivinculina y anticuerpos anti-CdtB procedentes de individuos sanos; y

seleccionar un tratamiento para el D-IBS si se diagnostica D-IBS.

7. El método según la reivindicación 1 o 6, donde la muestra biológica es sangre completa, suero o plasma.

8. El método según la reivindicación 1 o 6, donde la detección en la muestra biológica comprende usar un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA).

9. El método según la reivindicación 1 o 6, donde la detección en la muestra biológica comprende usar inmunohistoquímica, citometría de flujo, hibridación fluorescente *in situ* (FISH), radioinmunoensayos o purificación por afinidad.

10. El método según la reivindicación 1 o 6, donde los anticuerpos antivinculina son capaces de unirse específicamente a un epítipo sobre vinculina o SEQ ID NO: 7.

11. El método según la reivindicación 1 o 6, donde los anticuerpos anti-CdtB son capaces de unirse específicamente a un epítipo sobre CdtB de *Campylobacter jejuni* o SEQ ID NO: 5.

12. El método según la reivindicación 6, donde el nivel de control de anticuerpos antivinculina, anticuerpos anti-

CdtB o ambos es una medición de la densidad óptica.

- 5 13. El método según la reivindicación 6, donde el diagnóstico de D-IBS se realiza si el nivel de anticuerpos antivinculina es significativamente mayor que el nivel de control de anticuerpos antivinculina procedente de individuos sanos.
14. El método según la reivindicación 6, donde el diagnóstico de D-IBS se realiza si el nivel de anticuerpos anti-CdtB es significativamente mayor que el nivel de control de anticuerpos anti-CdtB procedente de individuos sanos.
- 10 15. El método según la reivindicación 6, donde el diagnóstico de D-IBS se realiza si tanto los niveles de anticuerpos antivinculina como de anticuerpos anti-CdtB son significativamente mayores que los niveles de control de anticuerpos antivinculina y anticuerpos anti-CdtB procedentes de individuos sanos.

DICUJOS

FIG. 1A

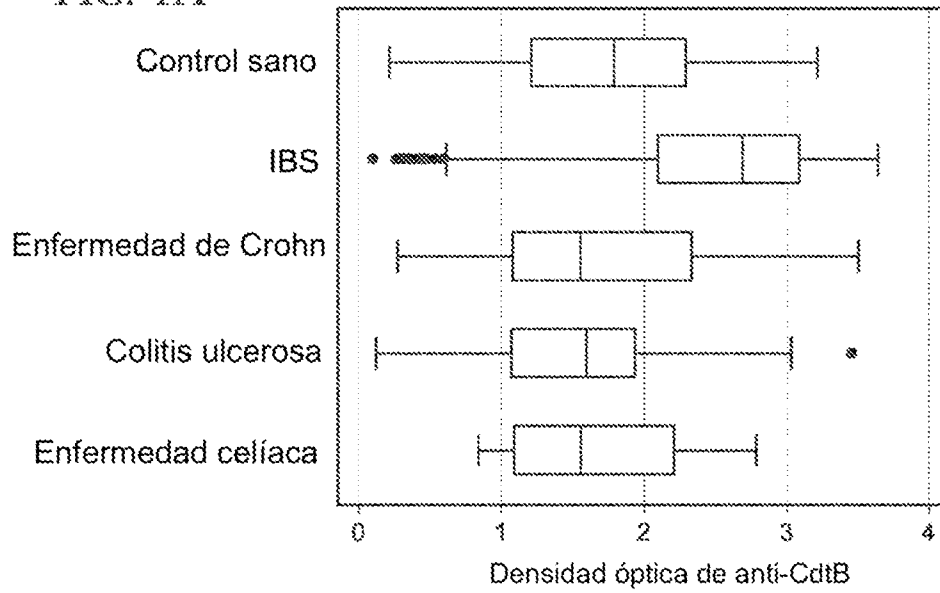


FIG. 1B

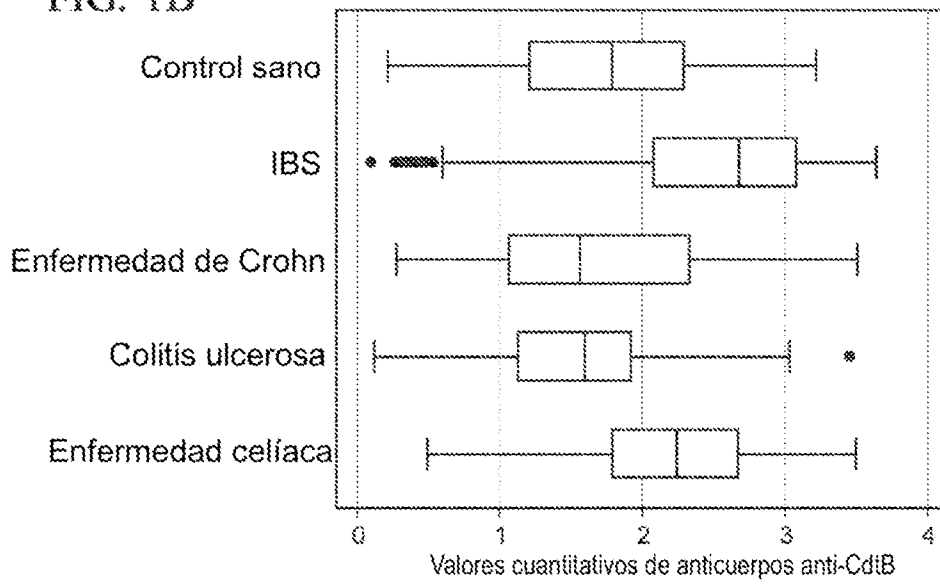


FIG. 2A

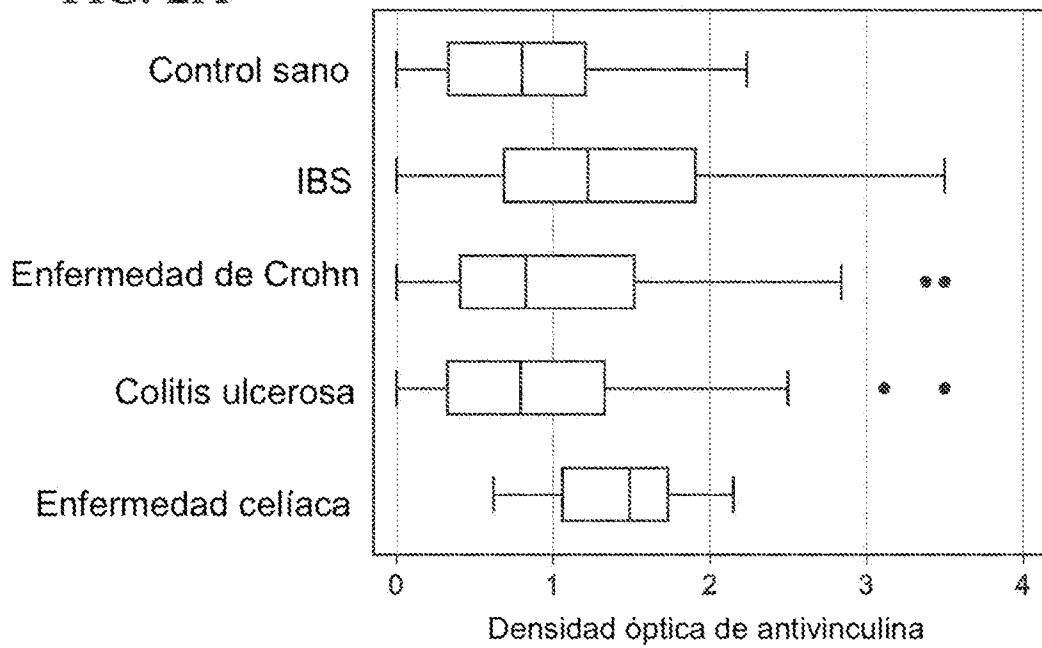


FIG. 2B

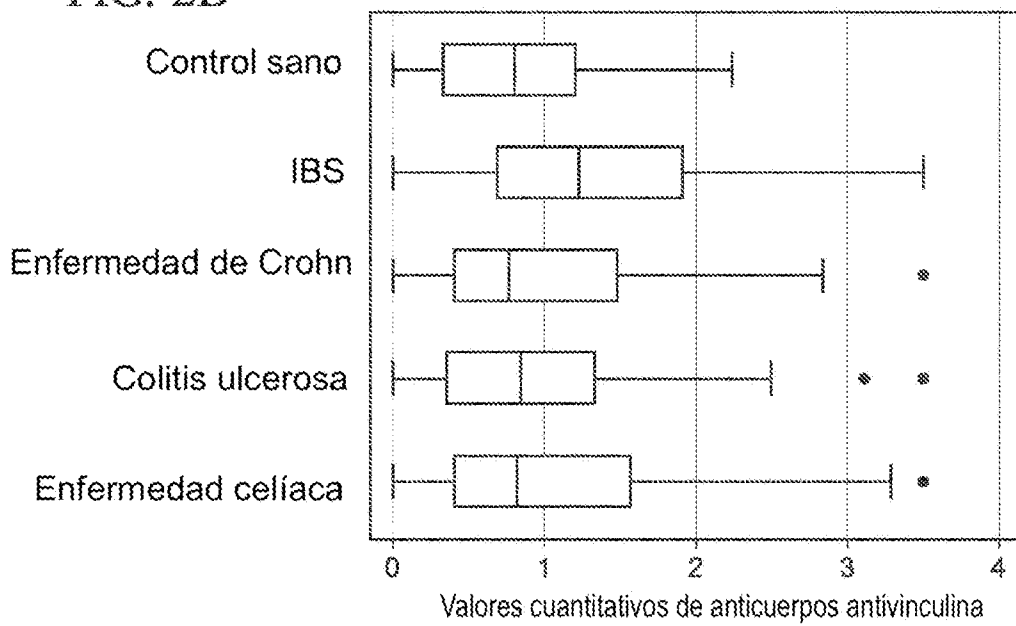


FIG. 3A

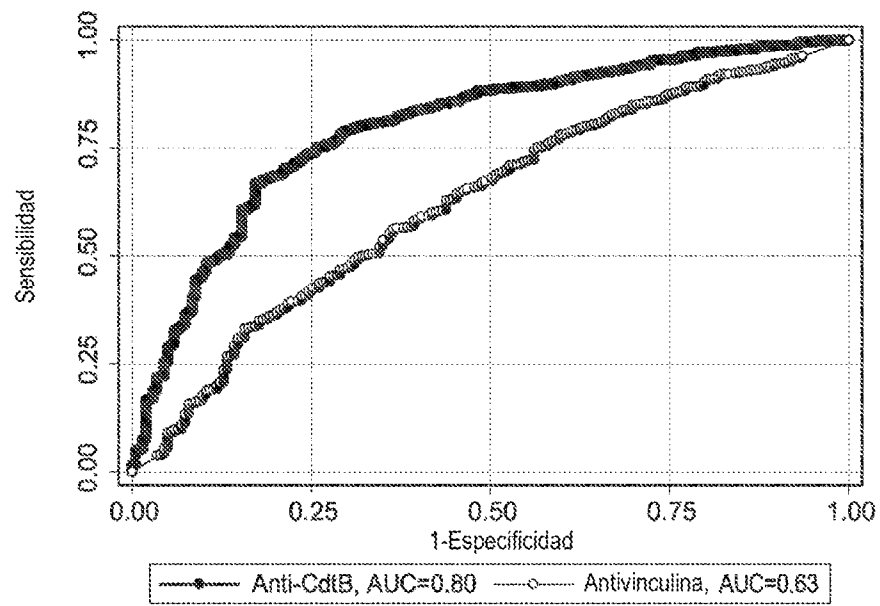


FIG. 3B

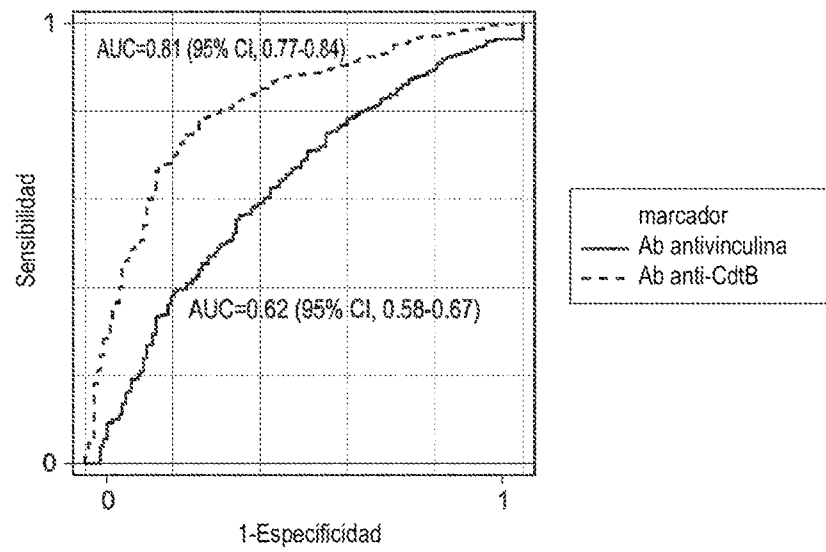


FIG. 3C

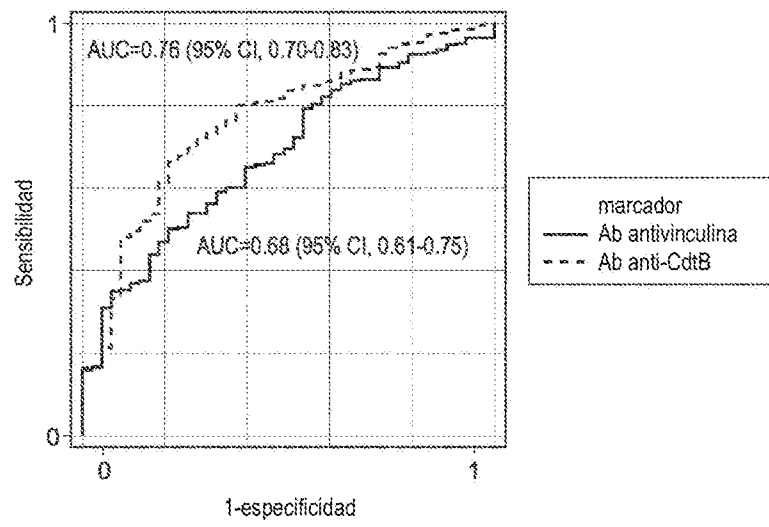


FIG. 4

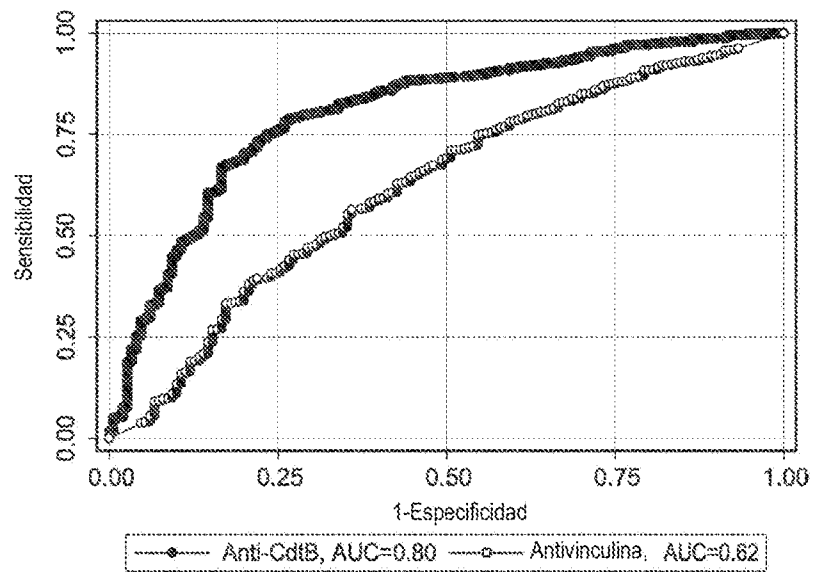


FIG. 5

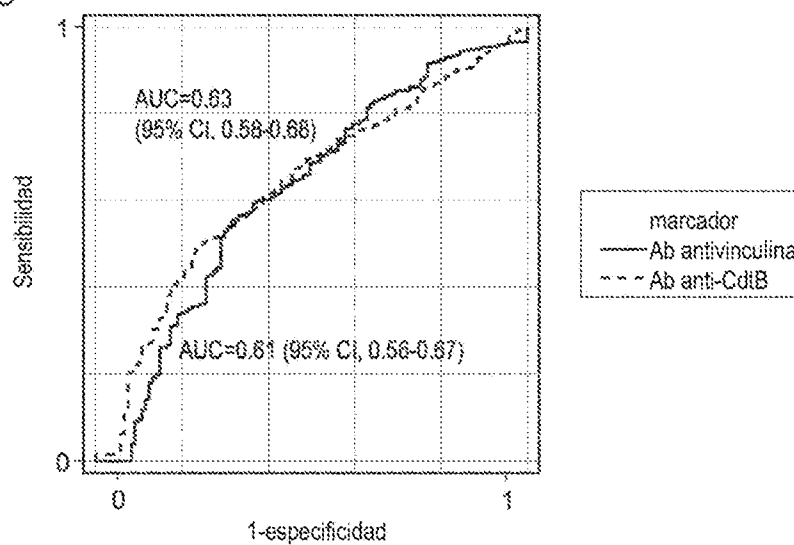


FIG. 6

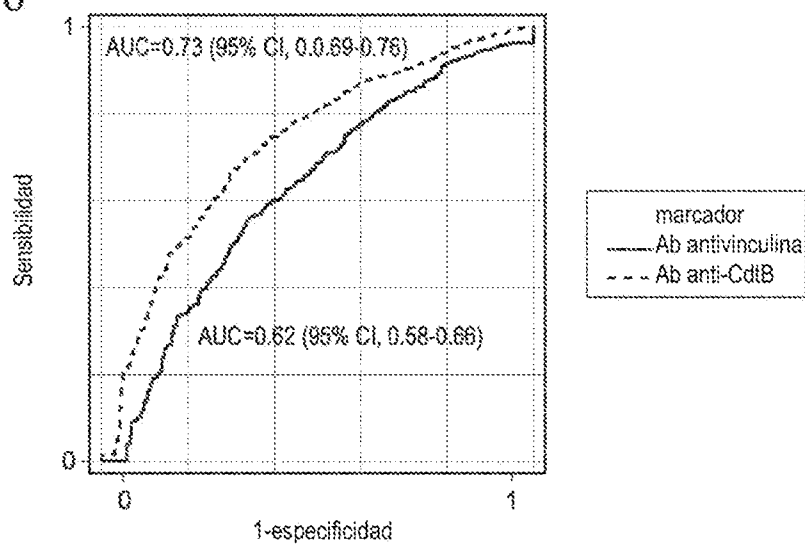


FIG. 7

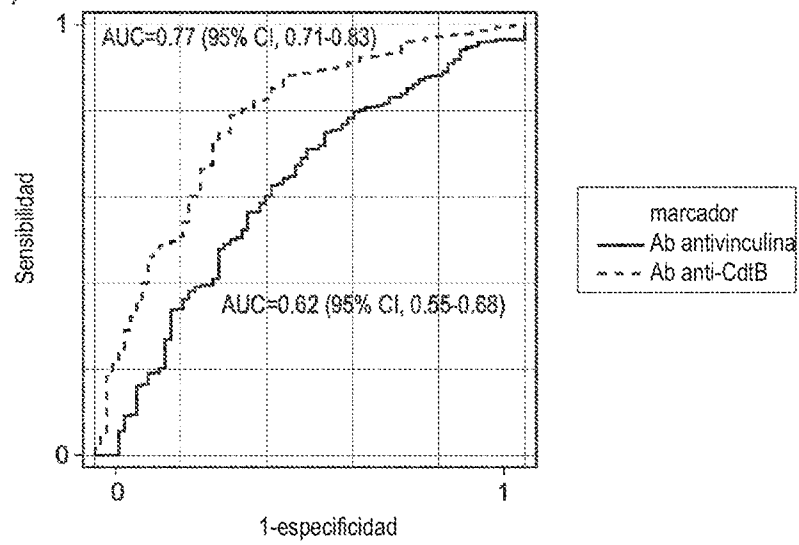


FIG. 8

