



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 325 059**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/551 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01996331 .3**

96 Fecha de presentación : **14.11.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1340078**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.2003**

54

Título: **Método para diferenciar el síndrome del intestino irritable de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) y para seguir personas con IBD usando la lactoferrina endógena total como marcador.**

30

Prioridad: **14.11.2000 US 248288 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.08.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.08.2009

73

Titular/es: **TechLab, Inc.**
2001 Kraft Drive
Blacksburg, Virginia 24060-6358, US

72

Inventor/es: **Boone, James, Hunter;**
Lyerly, David, Maxwell;
Wilkins, Tracy, Dale y
Guerrant, Richard, Littleton

74

Agente: **Martín Santos, Victoria Sofía**

ES 2 325 059 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para diferenciar el síndrome del intestino irritable de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) y para seguir personas con IBD usando la lactoferrina endógena total como marcador.

5

Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a la diferenciación clínica y al seguimiento de enfermedades gastrointestinales. Más particularmente, la presente invención se refiere a un método para contribuir a la diferenciación del síndrome del intestino irritable de la enfermedad inflamatoria *intestinal* por determinación del nivel de lactoferrina humana endógena total en muestras clínicas, tales como heces, moco y bilis, en las que un nivel elevado de lactoferrina excluye sustancialmente el diagnóstico de IBS y otras etiologías no inflamatorias, y un kit utilizable en dicho método. La presente invención se refiere además a un método para cuantificar el nivel de lactoferrina humana endógena total en muestras clínicas tales como heces, moco y bilis, para seguir la inflamación gastrointestinal en personas que tienen la enfermedad inflamatoria *intestinal*.

10
15

Las enfermedades gastrointestinales son responsables de una pérdida importante de vidas en todo el mundo. Por ejemplo, la diarrea es una causa principal de morbilidad y mortalidad en países en desarrollo con una estimación de mil millones de casos de enfermedades diarreicas y cinco millones de muertes en niños al año. En los Estados Unidos, de ocho a doce millones de personas se tratan cada año para diarreas infecciosas, que componen el 2,5% de las hospitalizaciones totales y dan como resultado 10.000 muertes. Otras enfermedades gastrointestinales incluyen la enfermedad inflamatoria *intestinal* (IBD) y el síndrome del intestino irritable (IBS). La evaluación anual de estos trastornos en los Estados Unidos da como resultado 1 y 3,5 visitas médicas, respectivamente. Los síntomas del IBS activo y los de la IBD activa son similares y, por consiguiente, las dos enfermedades se presentan con frecuencia de una forma casi idéntica. Sin embargo, la IBD puede ser una afección grave potencialmente mortal y, por lo tanto, es extremadamente importante un diagnóstico diferencial rápido y exacto.

20
25

La IBD, compuesta tanto por la enfermedad de Crohn (CD) como por la colitis ulcerosa (UC), se caracteriza por una respuesta inflamatoria inmunomediada crónica que da como resultado lesiones histológicas en el revestimiento intestinal. Tanto la CD como la UC presentan grandes números de leucocitos que migran a la mucosa y hacia la luz intestinal. Ambas enfermedades oscilan entre las fases activa (es decir, presencia de inflamación intestinal) e inactiva (es decir, de mínima a ninguna inflamación intestinal) de actividad de la enfermedad. La IBD activa puede incluir síntomas tales como diarrea sanguinolenta, dolor abdominal y fiebre. La fase inactiva presenta de mínima a ninguna inflamación intestinal y carece de enfermedad gastrointestinal grave.

30
35

Los pacientes que tienen IBD activa pero que presentan signos y síntomas moderados pueden ser difíciles de distinguir de los pacientes con IBS activo, un trastorno intestinal de la motilidad y del sistema nervioso intestinal. A diferencia de la IBD, el IBS no implica inflamación intestinal. En personas con IBS, el intestino parece normal bajo examen endoscópico y no hay leucocitos presentes en la mucosa o en las muestras fecales. Los síntomas pueden imitar los de la IBD e incluir hinchamiento, diarrea, estreñimiento y dolor abdominal grave y, con frecuencia, debilitante. Se estima que al menos 35 millones de norteamericanos padecen IBS.

40

La similitud en síntomas entre el IBS y la IBD hacen el diagnóstico rápido muy difícil. Sin embargo, dada la gravedad potencial de la IBD sin tratar, es crucial un diagnóstico diferencial. El diagnóstico de enfermedades gastrointestinales, en general, se sirve de ensayos de diagnóstico tales como ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), aglutinación con látex e inmunoensayo de flujo lateral. Estos ensayos son métodos rápidos y económicos para detectar marcadores en heces para patógenos entéricos e inflamación. Un marcador de interés particular que se ha descubierto que es el más específico para leucocitos en muestras fecales es la lactoferrina. La lactoferrina humana es una glicoproteína de 80 kilodaltons. Esta proteína de unión a hierro se secreta por la mayoría de las membranas mucosas. Es un componente principal de los gránulos secundarios que se encuentran en neutrófilos polimorfonucleares (PMN), un componente primario de la respuesta inflamatoria aguda. Otras células hematopoyéticas, tales como monocitos y linfocitos, no contienen lactoferrina, mientras que diversas secreciones corporales contienen niveles en el intervalo de mg/ml. Durante el proceso de la inflamación, los PMN infiltran el revestimiento de la mucosa del intestino delgado y grueso. Este aumento en el número de leucocitos tisulares activados y la exudación de plasma de la mucosa ulcerada dan como resultado un aumento en el nivel de lactoferrina que se encuentra en las heces. La proteína es resistente a proteólisis y, como tal, proporciona un marcador fecal no invasivo útil de inflamación intestinal.

45
50
55

Se ha usado la lactoferrina humana como un marcador para leucocitos fecales en varias aplicaciones. Por ejemplo, se ha usado la lactoferrina fecal como marcador para leucocitos para distinguir una diarrea no inflamatoria de una diarrea inflamatoria, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.124.252. La diarrea no inflamatoria causada por agentes tales como rotavirus, agentes tipo Norwalk y cólera, causa típicamente de mínimas a ninguna lesión intestinal y los pacientes responden fácilmente a la rehidratación oral. Las diarreas inflamatorias incluyen las causadas por patógenos entéricos tales como *Clostridium difficile*, especies de *Shigella*, especies de *Salmonella*, *Campylobacter jejuni* y *Entamoeba histolytica*, y las que no tienen un agente infeccioso claramente definido tales como la CD y la UC. La Patente de Estados Unidos N° 5.124.252 describe un ensayo *in vitro* para leucocitos fecales que ayuda a diferenciar una diarrea inflamatoria de una no inflamatoria. La patente 5.124.252 describe el ensayo de muestras fecales que se sospecha que contienen leucocitos con un ensayo que utiliza un anticuerpo para lactoferrina para determinar la presencia de leucocitos en la muestra fecal.

60
65

También se ha usado lactoferrina humana como marcador para el diagnóstico de trastornos gastrointestinales inflamatorios, pólipos de colon y cáncer colorrectal, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.552.292. Sin embargo, ni el método de la patente 5.124.252 ni el de la patente 5.552.292 describen utilidad en la diferenciación entre IBS e IBD. Las muestras ensayadas por el ensayo de la patente 5.124.252 son muestras sospechosas de contener leucocitos. Esta sospecha se debe a que el paciente presenta diarrea. Sin embargo, el 25-50% de las personas que tienen IBD no presentan diarrea y, por lo tanto, la patente 5.124.252 no se refiere al diagnóstico de la etiología en dichos pacientes. Como para la patente 5.552.292, el método descrito utiliza una dilución de la muestra 1:100 que no permite una cuantificación precisa de los niveles de lactoferrina. Además, la patente 5.552.292 describe el uso de formas parciales de moléculas para el ensayo, y no la lactoferrina endógena total, afectando de nuevo a la precisión de la cuantificación. El método de la patente 5.552.292 tampoco se refiere a utilizar los niveles de lactoferrina para distinguir entre IBD e IBS. La población ensayada en la patente 5.552.292, aunque incluye a personas con UC y CD, no incluye a personas que tienen IBS. Por lo tanto, continúa existiendo la necesidad en la industria del diagnóstico de un método no invasivo para diagnosticar de forma diferencial la IBD y el IBS, que utilice la lactoferrina humana como marcador.

Dado que se ha demostrado que la lactoferrina es un buen marcador para leucocitos fecales, se han desarrollado ensayos para ayudar a los médicos a determinar la presencia de lactoferrina fecal. Un ensayo de este tipo es el LEUKO-TEST®, fabricado por TechLab, Inc. de Blacksburg, Virginia. El LEUKO-TEST® es un ensayo de aglutinación con látex para detectar la lactoferrina fecal. No es invasivo y demuestra una inflamación intestinal activa, proporcionando de este modo a los médicos que están evaluando a pacientes con diarrea una información importante en lo que se refiere a la gravedad de cualquier infección bacteriana subyacente.

Aun cuando el LEUKO-TEST® es útil para evaluar enfermedades gastrointestinales, el formato de aglutinación con látex proporciona algunas limitaciones. En grandes hospitales con un gran volumen de muestras, se prefiere el procesamiento en lotes. Un formato tal como el ELISA es más útil para el procesamiento en lotes que la aglutinación con látex y tiene la opción de la automatización. También puede indicar la gravedad de la enfermedad y la eficacia de los tratamientos médicos, por medición de los niveles de lactoferrina fecal. En el caso de la IBD, un aumento en la lactoferrina fecal puede proporcionar un indicador temprano de una enfermedad activa y los efectos de los tratamientos médicos.

Actualmente, no existen ayudas de diagnóstico *in vitro* conocidas para ayudar a los médicos que realizan el tratamiento, u otro personal clínico, a diferenciar entre IBD e IBS. Por consiguiente, continúa existiendo la necesidad de una ayuda de diagnóstico *in vitro* para ayudar a los médicos que realizan el tratamiento y otro personal clínico a diferenciar entre estas dos enfermedades que se presentan comúnmente.

Sumario de la invención

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método no invasivo para diferenciar el síndrome del intestino irritable (IBS) de la enfermedad inflamatoria *intestinal* (IBD), en el que la presencia de lactoferrina fecal se usa como un marcador de detección para leucocitos fecales, cuyos niveles elevados excluyen diagnósticos de IBS y otras etiologías no inflamatorias. Este diagnóstico rápido puede utilizarse después por los profesionales de la atención sanitaria para prescribir el tratamiento apropiado. Se describen inmunoensayos adicionales, por ejemplo, inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA), que utilizan anticuerpos específicos para lactoferrina humana para la medición de la lactoferrina endógena total en muestras clínicas, tales como heces, moco y bilis humana, y un kit utilizable en dichos inmunoensayos. Todavía adicionalmente, se describen métodos para cuantificar los niveles de lactoferrina de fuentes endógenas, particularmente leucocitos infiltrantes, para seguir la inflamación gastrointestinal en personas que tienen IBD.

Se ha demostrado que la lactoferrina fecal tiene utilidad como marcador para distinguir pacientes con IBD de los que tienen un IBS menos grave. Para ayudar a los médicos y otro personal clínico en la utilización de este descubrimiento, se describen en este documento inmunoensayos para detectar niveles elevados de lactoferrina fecal y para cuantificar los niveles de lactoferrina fecal. En concreto, se describen un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) cualitativo en el que se utilizan anticuerpos policlonales contra la lactoferrina humana endógena total para detectar niveles elevados de lactoferrina fecal. El ensayo cualitativo permite la exploración de pacientes que presentan síntomas comunes entre el IBS y la IBD. Si se detectan niveles elevados de lactoferrina fecal, se excluye el diagnóstico de IBS. Se entenderá y apreciará por los especialistas en la técnica que también puede usarse un inmunoensayo cualitativo tal como una varilla de flujo lateral que utiliza anticuerpos tanto monoclonales como policlonales contra la lactoferrina endógena total para indicar la ausencia o presencia de una inflamación gastrointestinal.

El ensayo cualitativo proporciona un ensayo que es fácil de usar, sencillo de leer y preciso para distinguir la IBD activa del IBS activo. Para confirmar la equivalencia del ELISA con dispositivos precedentes, se han comparado los resultados de ensayo con los resultados de microscopía y con los resultados del ensayo de aglutinación con látex fabricado por TechLab, Inc. de Blacksburg, Virginia, bajo el nombre comercial LEUKO-TEST®. Con este fin, se realizaron dos estudios que implicaban un total de 166 muestras fecales. Cuando se comparaba con la microscopía, el ensayo de la presente invención presentaba una sensibilidad del 80,0% en el primer estudio y del 94,1% en el segundo estudio. El ensayo presentaba adicionalmente una especificidad del 90,0% en el primer estudio y del 51,7% en el segundo estudio. En los mismos estudios, cuando se comparaba con el LEUKO-TEST®, los resultados de sensibilidad eran del 92,5% en el primer estudio y del 89,6% en el segundo estudio. Los resultados de especificidad eran del 86,4% en el primer estudio y del 57,5% en el segundo estudio.

Para la evaluación del ensayo cualitativo de la presente invención como una ayuda de diagnóstico para pacientes con IBD e IBS, se recogieron muestras fecales de sujetos que tenían IBD y los resultados de ensayo se compararon con los de sujetos de control sanos y sujetos que presentaban casos clínicamente definidos de IBS. El grupo de IBD incluía sujetos que tenían tanto colitis ulcerosa (UC) como enfermedad de Crohn (CD). Los niveles de lactoferrina fecal determinados en estos sujetos se usaron para establecer la densidad óptica predictiva preferida para el ensayo de DO₄₅₀ de 0,200. Los resultados indicaban que el ensayo era positivo (es decir, una DO₄₅₀ superior a o igual a 0,200) para el 86,0% de las muestras fecales de sujetos con IBD activa y era sistemáticamente negativo (es decir, una DO₄₅₀ menor de 0,200) para muestras de sujetos con IBS activo y de sujetos de control sanos. (La "DO₄₅₀", como se usa en este documento, indica una densidad óptica medida a 450 nm en un espectrofotómetro de una sola longitud de onda).

En una evaluación clínica adicional, el ensayo cualitativo se comparó con evaluaciones clínicas de sujetos con IBD e IBS activo. En el grupo de IBD, había noventa y dos sujetos con enfermedad activa (cincuenta y uno con CD activa y cuarenta y uno con UC activa) y cincuenta y siete con enfermedad inactiva. En el grupo activo, un total de ochenta sujetos, o el 87,0%, dieron positivo con el ensayo. En el grupo inactivo, treinta y dos, o el 56,1%, dieron positivo en el ensayo. De los cincuenta y un sujetos con IBD con CD activa, cuarenta y cuatro, o el 86,3%, dieron positivo en el ensayo. De los cuarenta y un sujetos con IBD con UC activa, treinta y seis, o el 87,8%, dieron positivo con el ensayo. Los treinta y un sujetos, o el 100%, con IBS activa y los cincuenta y seis sujetos de control sanos, o el 100%, dieron negativo con el ensayo.

Los descubrimientos de investigación respaldan por lo tanto el uso del ensayo cualitativo como una ayuda de diagnóstico *in vitro* para detectar niveles elevados de lactoferrina como marcador de detección para leucocitos fecales y como indicador de inflamación. Otras enfermedades intestinales, incluyendo muchas infecciones gastrointestinales y cáncer colorrectal, dan como resultado con frecuencia niveles elevados de lactoferrina en muestras fecales, y estas muestras probablemente darán positivo en el ensayo. Por lo tanto, no puede establecerse un diagnóstico de IBD activa solamente en base a un resultado positivo con el ensayo de la presente invención. Sin embargo, un resultado positivo con el ensayo de la presente invención permitirá la exclusión de un diagnóstico de IBS u otras etiologías no inflamatorias.

También se describe un ELISA cuantitativo en el que se utilizan anticuerpos policlonales contra lactoferrina humana endógena total para cuantificar los niveles de inflamación gastrointestinal a través de la comparación con una curva patrón generada usando lactoferrina humana purificada. Después, estos niveles pueden utilizarse para seguir los efectos de tratamientos médicos en pacientes que tienen IBD.

En el ensayo cuantitativo, el nivel de lactoferrina humana endógena total en muestras clínicas se determina por comparación con una curva patrón generada usando lactoferrina humana purificada y analizada por regresión lineal. Los descubrimientos de investigación muestran que el nivel de lactoferrina fecal en personas que tienen IBS era inferior que el nivel medio de lactoferrina fecal determinado en personas sanas, indicando la ausencia de inflamación gastrointestinal. Sin embargo, los niveles de lactoferrina fecal en pacientes con IBD determinados usando el ensayo cuantitativo eran significativamente superiores que el nivel medio de lactoferrina fecal de personas sanas. Por lo tanto, el ensayo cuantitativo permitirá el seguimiento de pacientes que tienen IBD, ya que pueden determinarse los niveles de lactoferrina fecal a lo largo del transcurso de tratamientos médicos para determinar si el tratamiento es o no eficaz en la disminución o eliminación de la inflamación gastrointestinal.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a métodos de ensayo de diagnóstico para ayudar a diferenciar el síndrome del intestino irritable (IBS) de la enfermedad inflamatoria *intestinal* (IBD).

El método de ensayo de diagnóstico cualitativo de la presente invención es un inmunoensayo para la detección de niveles elevados de lactoferrina, un marcador de detección para leucocitos fecales y un indicador de inflamación intestinal. El método puede usarse como una ayuda de diagnóstico *in vitro* para ayudar a identificar pacientes con IBD activa y descartar los que tienen IBS activo, que no es inflamatorio. Los inmunoensayos específicos de lactoferrina pueden usarse para diferenciar IBS de IBD midiendo el nivel de lactoferrina endógena total. La "lactoferrina endógena total", como se usa esa expresión en este documento, comprende lactoferrina procedente de fuentes endógenas, particularmente leucocitos infiltrantes (es decir, leucocitos, plasma, bilis y secreciones mucosas).

Los siguientes son ejemplos de procedimientos que se han utilizado para establecer los ensayos cualitativos y cuantitativos preferidos de acuerdo con la presente invención. Los siguientes ejemplos son meramente ejemplares y no se presentan a modo de limitación.

1. Ensayo cualitativo

a. Establecimiento del factor de dilución de muestra y de la densidad óptica óptimos

El ensayo de la presente invención se diseñó y desarrolló para detectar niveles de lactoferrina fecal a un nivel inferior al detectable por dispositivos precedentes, específicamente el LEUKO-TEST®. El límite de detección inferior del LEUKO-TEST® es de 256 ng/ml con lactoferrina humana purificada. En el LEUKO-TEST®, una dilución de muestra de 1:50 y un límite de detección mínimo de 256 ng/ml proporcionan un límite de detección inferior en

ES 2 325 059 T3

muestras fecales de aproximadamente 12 $\mu\text{g/ml}$. Una dilución de muestra de 1:400 y un límite de detección mínimo para el ensayo de la presente invención de 32 ng/ml también proporcionan un límite de detección inferior en muestras fecales de aproximadamente 12 $\mu\text{g/ml}$. Por consiguiente, se seleccionó una dilución de muestra de 1:400 para el ensayo de la presente invención. De forma similar, se selecciona una densidad óptica de DO_{450} de 0,200 para el ensayo. (Como se usa en este documento, la DO_{450} indica una densidad óptica obtenida espectrofotométricamente a 450 nm en un espectrofotómetro de una sola longitud de onda).

Se entenderá y apreciará por los especialistas en la técnica que el factor de dilución y las densidades ópticas preferidas se han determinado basándose en los reactivos actualmente disponibles y considerados como óptimos. Sin embargo, pueden mejorarse y volverse deseables con el tiempo reactivos distintos de los deseados actualmente. Las variaciones en los reactivos pueden producir factores de dilución y/o densidades ópticas preferibles/óptimas distintas de las determinadas en este documento. Se contemplan que dichas variaciones se incluyan en el alcance de la presente invención. La clave para determinar los valores óptimos se basa en la sensibilidad como se describe más completamente a continuación.

Para verificar que la dilución de muestra 1:400 proporciona la sensibilidad más deseable con los reactivos actuales, se analizaron 121 muestras fecales que comparaban una dilución 1:400 con una dilución 1:800. (La sensibilidad se calcula en este documento dividiendo el número de muestras tomadas de sujetos con IBD que producen un resultado positivo en el ensayo entre el número de muestras tomadas de sujetos con IBD). Se evaluaron adicionalmente los resultados de ensayo comparando los valores de DO_{450} de 0,200 con los valores de DO_{450} de 0,300. Los resultados se compararon con microscopía para leucocitos fecales y con el LEUKO-TEST[®]. Los resultados se resumen en las Tablas I-VIII a continuación.

TABLA I

Comparación del ELISA con microscopía para leucocitos fecales usando una dilución 1:400 y una DO_{450} de 0,200

ELISA frente a microscopía (N = 121)	Positivas por microscopía	Negativas por microscopía
Positivas por ELISA	32	42
Negativas por ELISA	2	45
Sensibilidad relativa	94,0%	
Especificidad relativa	52,0%	
Correlación	64,0%	

TABLA II

Comparación del ELISA con microscopía para leucocitos fecales usando una dilución 1:400 y una DO_{450} de 0,300

ELISA frente a microscopía (N = 121)	Positivas por microscopía	Negativas por microscopía
Positivas por ELISA	31	31
Negativas por ELISA	3	56
Sensibilidad relativa	91,0%	
Especificidad relativa	64,0%	
Correlación	72,0%	

ES 2 325 059 T3

TABLA III

Comparación del ELISA con microscopía para leucocitos fecales usando una dilución 1:800 y una DO₄₅₀ de 0,200

ELISA frente a microscopía (N = 121)	Positivas por microscopía	Negativas por microscopía
Positivas por ELISA	30	31
Negativas por ELISA	4	56
Sensibilidad relativa	88,0%	
Especificidad relativa	64,0%	
Correlación	77,0%	

TABLA IV

Comparación del ELISA con microscopía para leucocitos fecales usando una dilución 1:800 y una DO₄₅₀ de 0,300

ELISA frente a microscopía (N = 121)	Positivas por microscopía	Negativas por microscopía
Positivas por ELISA	26	24
Negativas por ELISA	8	63
Sensibilidad relativa	77,0%	
Especificidad relativa	72,0%	
Correlación	74,0%	

TABLA V

Comparación del ELISA con el LEUKO-TEST® usando una dilución 1:400 y una DO₄₅₀ de 0,200

ELISA frente a LEUKO- TEST® (N = 121)	Positivas por LEUKO-TEST®	Negativas
Positivas por ELISA	43	31
Negativas por ELISA	5	42
Sensibilidad relativa	89,6%	
Especificidad relativa	57,5%	
Correlación	70,2%	

ES 2 325 059 T3

TABLA VI

Comparación del ELISA con el LEUKO-TEST® usando una dilución 1:400 y una DO₄₅₀ de 0,300

ELISA frente a LEUKO-TEST® (N = 121)	Positivas por LEUKO-TEST®	Negativas por LEUKO-TEST®
Positivas por ELISA	41	21
Negativas por ELISA	7	52
Sensibilidad relativa	85,0%	
Especificidad relativa	71,2%	
Correlación	77,0%	

TABLA VII

Comparación del ELISA con el LEUKO-TEST® usando una dilución 1:800 y una DO₄₅₀ de 0,200

ELISA frente a LEUKO-TEST® (N = 121)	Positivas por LEUKO-TEST®	Negativas por LEUKO-TEST®
Positivas por ELISA	39	22
Negativas por ELISA	9	51
Sensibilidad relativa	81,3%	
Especificidad relativa	69,9%	
Correlación	74,4%	

TABLA VIII

Comparación del ELISA con el LEUKO-TEST® usando una dilución 1:800 y una DO₄₅₀ de 0,300

ELISA frente a LEUKO-TEST® (N = 121)	Positivas por LEUKO-TEST®	Negativas por LEUKO-TEST®
Positivas por ELISA	34	16
Negativas por ELISA	14	57
Sensibilidad relativa	70,8%	
Especificidad relativa	78,1%	
Correlación	75,2%	

En resumen, una dilución de muestra fecal de 1:400 y una DO₄₅₀ de ensayo de 0,200 mostraban el nivel de sensibilidad más elevado con los reactivos actuales. Por consiguiente, se determinó que estas condiciones eran óptimas para el ensayo de la presente invención. Las muestras fecales normales contienen bajos niveles de lactoferrina y se ha determinado que las diluciones 1:400 son óptimas en la detección de un aumento en la lactoferrina sobre los niveles de fondo. El uso de diluciones inferiores a 1:400 puede dar como resultado resultados de ensayo positivos debido a la presencia de niveles de lactoferrina normales.

b. Recogida de muestras y preparación de diluciones

Los procedimientos de recogida y manipulación convencionales usados típicamente para muestras fecales para cultivo pueden usarse en la recogida de muestras para el ensayo de la presente invención. En la realización preferida, se ensayarán muestras fecales en las veinticuatro horas siguientes a su recogida. Sin embargo, si el ensayo no

ES 2 325 059 T3

se va a realizar en las cuarenta y ocho horas siguientes a la recogida, se prefiere que las muestras se almacenen a -20°C o menos. Además, se prefiere que las muestras recogidas se transporten y se diluyan en el Diluyente tan pronto como sea posible después de la recogida y, una vez diluidas, que las muestras se almacenen a entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C. Se prefiere que las muestras se mezclen (es decir, usando una mezcladora vorticial) minuciosamente antes de realizar el ensayo de la presente invención. Esto incluye la mezcla completa de la muestra antes de la transferencia al Diluyente, como se describe más completamente a continuación, así como la mezcla completa de la muestra diluida antes de realizar el ensayo.

Se usó el siguiente método para preparar una muestra diluida a partir de una muestra fecal líquida. Se prepararon dos tubos de plástico para cada muestra a ensayar. Para cada muestra, se añadieron posteriormente 950 µl de Diluyente 1X (preparado como se describe más completamente a continuación) a cada uno de los dos tubos. Usando una pipeta de transferencia, se añadió una gota (es decir, aproximadamente 50 µl) de muestra fecal líquida a uno de los tubos y se mezcló minuciosamente usando una mezcladora vorticial. Posteriormente, se transfirió una gota de la muestra diluida al segundo tubo, que contenía 950 µl de Diluyente 1X (preparado como se describe más completamente a continuación). El resultado era una dilución 1:400 de la muestra en el segundo tubo. Por lo tanto, se usó solamente el segundo tubo durante el resto del procedimiento de ensayo.

Se usó el siguiente método para preparar una muestra diluida a partir de una muestra fecal formada o sólida. Se prepararon dos tubos de plástico para cada muestra a ensayar. Para cada muestra, se añadieron 1,9 ml de Diluyente 1X (preparado como se describe más completamente a continuación) a sólo uno de los dos tubos. Posteriormente, se añadieron 0,10 g de muestra fecal a este tubo y se mezclaron minuciosamente usando una mezcladora vorticial. A continuación, se añadieron 950 µl del Diluyente 1X (preparado como se describe más completamente a continuación) al segundo tubo y se transfirió una gota (es decir, aproximadamente 50 µl) de la muestra previamente diluida al segundo tubo. El resultado era una dilución 1:400 de la muestra en el segundo tubo. Por lo tanto, se usó solamente el segundo tubo durante el resto del procedimiento de ensayo.

La muestra en el segundo tubo preparada de acuerdo con cualquiera de los procedimientos anteriores se mezcló en una mezcladora vorticial durante aproximadamente diez segundos y posteriormente se almacenó a entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C hasta que se realizó el resto del procedimiento de ensayo. Antes de transferir la muestra diluida a un pocillo de microtitulación de acuerdo con el procedimiento de ensayo, como se describe más completamente a continuación, la muestra se mezcló minuciosamente en la mezcladora vorticial otra vez. Este procedimiento buscaba asegurar una mezcla minuciosa de la muestra.

c. Reactivos necesarios para el ensayo y preparación de los mismos

Eran necesarios varios reactivos para realizar la realización preferida del ensayo cualitativo de la presente invención. Estos reactivos incluían Diluyente 10X, Diluyente 1X, Conjugado, Sustrato, Control Positivo, Solución Tampón de Lavado y Solución de Parada. El Diluyente 10X era un concentrado 10X de una solución de proteínas tamponada que contenía timerosal al 0,2% como conservante. El Diluyente se suministró como un concentrado 10X. Por lo tanto, para preparar el Diluyente 1X necesario para el ensayo de la presente invención, se diluyó un volumen total de 400 ml por adición de 40 ml del concentrado 10X a 360 ml de agua desionizada. Cualquier diluyente 1X sin usar se almacenó a entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C.

El Conjugado usado con el ensayo de la presente invención comprende preferiblemente anticuerpo policlonal de conejo específico para lactoferrina humana conjugado con peroxidasa de rábano picante, y en una solución de proteínas tamponada que contiene timerosal al 0,02% como conservante. El Sustrato usado con el ensayo de la presente invención comprende preferiblemente una solución que contiene sustrato de tetra-metil-bencidina y peroxidasa. El Control Positivo usado con el ensayo de la presente invención comprende preferiblemente lactoferrina humana en una solución de proteínas tamponada que contiene timerosal al 0,02% como conservante. La Solución de Parada usada con el ensayo de la presente invención comprende preferiblemente ácido sulfúrico 0,6 N.

La Solución Tampón de Lavado usada con el ensayo de la presente invención se suministró como un concentrado 20X que contenía solución salina tamponada con fosfato, detergente y timerosal al 0,2% como conservante. Para preparar la Solución de Lavado 1X necesaria para el ensayo de la presente invención, se diluyó un volumen total de un litro de concentrado por adición de 50 ml del concentrado a 950 ml de agua desionizada. Cualquier Solución de Lavado 1X sin usar se almacenó a entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C.

Se prefieren para el ensayo de la presente invención placas de microensayo que contienen doce tiras y ocho pocillos por tira. Cada muestra y cada control requieren un solo pocillo recubierto. Para preparar las placas, cada tira se recubrió con anticuerpo policlonal purificado específico para lactoferrina. Las placas de microensayo se almacenaron con desecante.

Todos los reactivos se almacenaron a temperatura ambiente antes del uso en el ensayo de la presente invención.

La presente invención incluye un kit diseñado y preparado para realizar el ensayo cuantitativo. En la realización preferida, el kit contiene 40 ml de Diluyente 10X, 7 ml de Conjugado, 14 ml de Sustrato, 3,5 ml de Control Positivo, 50 ml de Solución Tampón de Lavado, 7 ml de Solución de Parada y una placa de microensayo almacenada con desecante. El ensayo de la presente invención utiliza anticuerpos contra lactoferrina humana. La placa de microensayos

ES 2 325 059 T3

suministrada con el kit contiene anticuerpo policlonal inmovilizado contra lactoferrina. El anticuerpo de detección consiste en un anticuerpo policlonal conjugado con peroxidasa de rábano picante.

d. *Procedimiento del ensayo*

5 Para realizar el ensayo cualitativo de la presente invención, se determinó inicialmente el número de pocillos necesarios. Cada muestra o control requería un pocillo y, por lo tanto, el número de pocillos se determinó en consecuencia. A continuación, se añadió una gota (es decir, aproximadamente 50 μ l) de Control Positivo a un solo pocillo designado como Pocillo de Control Positivo y se añadió una gota (es decir, aproximadamente 50 μ l) de Diluyente 1X a un solo
10 pocillo designado como Pocillo de Control Negativo. Posteriormente, se añadieron dos gotas (es decir, aproximadamente 100 μ l) de muestra diluida 1:400 (preparado de acuerdo con el procedimiento anterior) a un tercer pocillo y todos los pocillos se incubaron a aproximadamente 37°C (\pm 2°C) durante aproximadamente treinta minutos. Después de la incubación, el contenido de los pocillos de ensayo se desechó en un recipiente de desecho.

15 A continuación, se lavó cada pocillo usando Solución de Lavado 1X (preparada como se ha descrito anteriormente) y dispuesta en un frasco lavador con una boquilla de punta fina. De esta forma, la Solución de Lavado 1X se dirigía hacia el fondo de cada uno de los pocillos con cierta fuerza. Cada pocillo se rellenó con la Solución de Lavado 1X y el contenido del mismo se desechó posteriormente en un recipiente de desecho. La placa de microensayo se invirtió y se sacudió después en una toalla de papel secante. Este procedimiento de lavado se realizó un mínimo de cuatro
20 veces usando una toalla de papel secante cada vez. Si se observaba cualquier materia particulada en los pocillos, se continuaba con el procedimiento de lavado hasta que se eliminaba la materia.

Posteriormente, se añadió una gota (es decir, aproximadamente 50 μ l) de Conjugado a cada pocillo y los pocillos se incubaron a aproximadamente 37°C (\pm 2°C) durante aproximadamente treinta minutos. Después de la incubación, se desechó el contenido de los pocillos de ensayo en un recipiente de desecho y se repitió el procedimiento de lavado. A
25 continuación, se añadieron dos gotas (es decir, aproximadamente 100 μ l) de sustrato a cada pocillo y los pocillos se golpearon suavemente para mezclar el contenido. Los pocillos se incubaron después a temperatura ambiente durante aproximadamente quince minutos. Los pocillos se golpearon suavemente varias veces durante el periodo de incubación.

30 A continuación, se añadió una gota (es decir, 50 μ l) de Solución de Parada a cada pocillo y los pocillos se golpearon suavemente. Los pocillos se dejaron reposar a temperatura ambiente durante aproximadamente dos minutos antes de la lectura. La adición de Solución de Parada convertía el color azul en un color amarillo que después podía cuantificarse midiendo la densidad óptica a 450 nm en un lector de ELISA de microplacas. El instrumento se calibró frente al control negativo y la parte inferior de cada pocillo se limpiaba antes de medir la densidad óptica. Se registraron
35 las densidades ópticas (DO_{450} y $DO_{450/620}$) para el Pocillo de Control Positivo, el Pocillo de Control Negativo y cada muestra ensayada. (La " $DO_{450/620}$ ", como se usa en este documento, indica una densidad óptica obtenida espectrofotométricamente 450/620 nm o en un espectrofotómetro de doble longitud de onda). Se calculó el promedio de lecturas de pocillos por duplicado antes de que se interpretaran los resultados.

40 El procedimiento de ensayo especificado representa la realización preferida ya que se obtienen resultados óptimos siguiendo el procedimiento especificado puesto que los reactivos, concentraciones, condiciones de incubación y especificaciones de procesamiento se han optimizado para sensibilidad y especificidad. Por consiguiente, las alteraciones del procedimiento especificado y/o de las condiciones de ensayo indicadas pueden afectar a la sensibilidad y especificidad del ensayo.

45 e. *Control de calidad*

El control positivo y negativo debe cumplir ciertos criterios para que el ensayo sea válido. En primer lugar, el Pocillo de Control Positivo debe ser de un color amarillo visible y, cuando se lea en un espectrofotómetro, debe tener
50 una DO_{450} y una $DO_{450/620} > 0,500$. El Pocillo de Control Negativo debe tener una $DO_{450} < 0,200$ o una $DO_{450/620} < 0,160$. Para asegurar que no se ha producido arrastre de impurezas, el ensayo debería repetirse si una muestra da un resultado positivo débil (es decir, $< 0,400$) y está adyacente a un pocillo positivo fuerte.

f. *Interpretación de los Resultados*

55 Se midieron las densidades ópticas a 450 nm en un espectrofotómetro de una sola longitud de onda y a 450/620 nm en un espectrofotómetro de doble longitud de onda. En un espectrofotómetro de una sola longitud de onda, una DO_{450} de menos de 0,200 indicaba un resultado negativo y una DO_{450} de más de o igual a 0,200 indicaba un resultado positivo. En un espectrofotómetro de doble longitud de onda, una $DO_{450/620}$ de menos de 0,160 indicaba un resultado
60 negativo y una $DO_{450/620}$ de más de o igual a 0,160 indicaba un resultado positivo. Un resultado de ensayo positivo indicaba que la muestra contenía niveles elevados de lactoferrina cuando se comparaba con un valor de referencia establecido para sujetos de control sanos. Un resultado de ensayo negativo indicaba que la muestra no contenía niveles elevados de lactoferrina con respecto a muestras de sujetos de control sanos.

65 g. *Resultados*

Ciento cuarenta y nueve sujetos que tenían IBD se ensayaron de acuerdo con el procedimiento anterior. Setenta y siete de los sujetos, o el 51,7%, eran masculinos y setenta y dos de ellos, o el 48,3%, eran femeninos. La relación

ES 2 325 059 T3

de sujetos masculinos respecto a femeninos ensayados se aproxima estrechamente a la relación 1:1 observada en la población general de pacientes con IBD. Las edades de los sujetos oscilaban de 3 años a 78 años y treinta y dos sujetos, o el 22%, eran de 16 años de edad o más jóvenes. Setenta y siete sujetos, o el 51,7%, tenían CD y setenta y dos de ellos, o el 48,3%, tenían UC.

Se ensayaron treinta y un sujetos que tenían IBS. Seis de los sujetos, o el 19,3%, eran masculinos y veinticinco de ellos, o el 80,7%, eran femeninos. La relación de sujetos masculinos respecto a femeninos ensayados se aproxima estrechamente a la relación 1:3 observada en la población general con IBS. Las edades de los sujetos oscilaban de 19 años a 78 años.

También se ensayaron cincuenta y seis sujetos sanos como controles. Veintiocho de los sujetos, o el 50%, eran masculinos y veintiocho de ellos, o el 50%, eran femeninos. Las edades de los sujetos oscilaban desde lactantes hasta los 79 años. Se ilustra un resumen de la población de sujetos ensayados en la Tabla IX.

TABLA IX

Resumen de población de sujetos

Resumen de historias clínicas (N = 180)	Sujetos totales
Número total de pacientes con IBD	149
Nº sujetos masculinos	77
Nº sujetos femeninos	72
Número total de pacientes con CD	77
Nº sujetos masculinos	43
Nº sujetos femeninos	34
Número total de pacientes con UC	72
Nº sujetos masculinos	34
Nº sujetos femeninos	38
Número total de pacientes con síndrome del intestino irritable	31
Nº sujetos masculinos	6
Nº sujetos femeninos	25
Número total de personas sanas	56
Nº sujetos masculinos	28
Nº sujetos femeninos	28

Se recogieron muestras fecales de cada sujeto inscrito y se almacenaron a -70°C hasta que se ensayaron. Las consistencias de las muestras oscilaban de líquida a sólida, ilustrándose números de las mismas en la Tabla X para cada grupo de sujetos. Como puede observarse, cuarenta y cinco de las muestras de IBD eran muestras líquidas, sesenta y dos eran muestras semi-sólidas y cuarenta y dos eran muestras sólidas. Una de las muestras de IBS era una muestra líquida, trece eran muestras semi-sólidas y diecisiete eran muestras sólidas. Todas las muestras de sujetos de control sanos eran sólidas.

TABLA X

Resumen de consistencias de muestras para cada grupo de sujetos

Resumen de muestras de heces (N = 236)	Muestras totales
Número total de pacientes con IBD (CD y UC)	149
Número total de muestras líquidas	45
Número total de muestras semi-sólidas	62
Número total de muestras sólidas	42
Número total de pacientes con IBS	31
Número total de muestras líquidas	1
Número total de muestras semi-sólidas	13
Número total de muestras sólidas	17
Número total de personas sanas	56
Número total de muestras líquidas	0
Número total de muestras semi-sólidas	0
Número total de muestras sólidas	56

ES 2 325 059 T3

El nivel de lactoferrina fecal en cada muestra se determinó usando el ELISA cualitativo de lactoferrina como se ha descrito anteriormente. Se usó una dilución de muestra de 1:400. Los resultados se describieron como positivos si se observaba una densidad óptica de más de o igual a 0,200. Por el contrario, los resultados se describieron como negativos si se observaba una densidad óptica de menos de 0,200.

Del grupo de sujetos con IBD, noventa y dos sujetos tenían enfermedad activa y cincuenta y siete tenían enfermedad inactiva. Del grupo activo, un total de ochenta sujetos, o el 87,0%, dieron positivo en el ensayo. Del grupo inactivo, un total de treinta y dos sujetos, o el 56,1%, dieron positivo en el ensayo. De los cuarenta y un sujetos que tenían UC activa, un total de treinta y seis sujetos, o el 87,8%, dieron positivo en el ensayo. De los cincuenta y un sujetos que tenían CD activa, cuarenta y cuatro, o el 86,3%, dieron positivo en el ensayo. Los treinta y un pacientes que tenían IBS activo y los cincuenta y seis sujetos de control sanos dieron negativo en el ensayo. Se ilustra un resumen de los resultados de ensayo del experimento en la Tabla XI y se ilustran diversas comparaciones individuales en las Tablas XII, XIII y XIV, como se describe más completamente a continuación.

TABLA XI

Resumen de los resultados de ensayo de ELISA para sujetos con CD, UC, IBS activa y de control sanos

Evaluaciones clínicas N = 236	Total	Positivos por ELISA	Negativos por ELISA
IBD totales	149	75,2% (112)	24,8% (37)
Activa	92	87,0% (80)	13,0% (12)
Inactiva	57	56,1% (32)	43,0% (25)
CD totales	77	77,9% (60)	22,1% (17)
Activa	56	86,3% (44)	13,7% (7)
Inactiva	26	61,5% (16)	38,5% (10)
UC totales	72	72,2% (52)	27,7% (20)
Activa	41	87,8% (36)	12,2% (5)
Inactiva	31	51,6% (16)	48,4% (15)
IBS activo totales	31	0	100,0% (31)
Personas sanas totales	56	0	100,0% (56)

Cuando se estaban distinguiendo muestras de sujetos con IBD activa de muestras de sujetos que tenían IBS o de muestras de controles sanos, el ELISA presentaba una sensibilidad del 87% y una especificidad del 100%. La sensibilidad se calculó dividiendo el número de personas que tenían IBD y que daban positivo en el ELISA entre el número de sujetos que tenían IBD. La especificidad se calculó dividiendo el número de sujetos que tenían IBS y que daban positivo en el ELISA entre el número de sujetos que daban positivo en el ELISA. Los valores predictivos positivo y negativo eran del 100% y del 87,9%, respectivamente, y la correlación era del 93,3%. Estos resultados se resumen en la Tabla XII.

TABLA XII

Evaluación estadística usando el ELISA para distinguir la IBD activa de sujetos con IBS/de control sanos

N = 179	IBD activa	IBS/Controles sanos
Positivos por ELISA	80	0
Negativos por ELISA	12	87
Sensibilidad	87,0%	
Especificidad	100%	
Valor Predictivo Positivo	100%	
Valor Predictivo Negativo	87,9%	
Correlación	93,3%	

ES 2 325 059 T3

5 Cuando se estaban distinguiendo muestras de sujetos con UC activa de muestras de sujetos que tenían IBS o de sujetos de control sanos, el ELISA presentaba una sensibilidad del 87,8% y una especificidad del 100%. Los valores predictivos positivo y negativo eran del 100% y del 94,6%, respectivamente, y la correlación era del 96,1%. Estos resultados se resumen en la Tabla XIII.

TABLA XII

10 *Evaluación estadística usando el ELISA para distinguir la UC activa de sujetos con IBS/de control sanos*

N = 128	UC activa	IBS/Controles sanos
Positivos por ELISA	36	0
Negativos por ELISA	5	87
Sensibilidad	87,8%	
Especificidad	100%	
Valor predictivo positivo	100%	
Valor predictivo negativo	94,6%	
Correlación	96,1%	

25 Cuando se estaban distinguiendo muestras de sujetos que tenían CD activa de muestras de sujetos que tenían IBS o de muestras de controles sanos, el ELISA presentaba una sensibilidad del 86,3% y una especificidad del 100%. Los valores predictivos positivo y negativo eran del 100% y del 92,6%, respectivamente, y la correlación era del 94,9%. Estos resultados se resumen en la Tabla XIV.

TABLA XIV

35 *Evaluación estadística usando el ELISA para distinguir la CD activa de sujetos con IBS/de control sanos*

N = 138	UC activa	IBS/Controles sanos
Positivos por ELISA	44	0
Negativos por ELISA	7	87
Sensibilidad	86,3%	
Especificidad	100%	
Valor predictivo positivo	100%	
Valor predictivo negativo	92,6%	
Correlación	94,9%	

h. Reproducibilidad y precisión

55 Se determinó la variación inter-ensayo por análisis de ocho muestras fecales negativas para lactoferrina y ocho positivas para lactoferrina a lo largo de un periodo de tres días. El % de coeficiente de variación (CV) promedio era del 23,5% para las muestras positivas y del 7,4% para las muestras negativas. La variación intra-ensayo se determinó por análisis de doce muestras fecales usando seis repeticiones en un lote de kits. El análisis intra-ensayo oscilaba en % de CV del 2,7 al 24,0, con un promedio del 8,7%.

60 2. Ensayo cuantitativo

65 En el ensayo cuantitativo de la presente invención, preferiblemente se realizaron diluciones seriadas de diez veces de las muestras fecales y se añadieron a pocillos de microtitulación que contenían anticuerpos policlonales inmovilizados contra lactoferrina humana. Si existe lactoferrina endógena, se unirá a los anticuerpos durante una incubación a aproximadamente 37°C. Después de la incubación, se añade un conjugado compuesto por anticuerpos policlonales acoplados a la enzima peroxidasa de rábano picante y se deja que se una a la lactoferrina capturada. Después, se lava del pocillo el conjugado no unido y se añade un sustrato componente (por ejemplo, tetra-metil-bencidina y peróxido

ES 2 325 059 T3

de hidrógeno) para el desarrollo de color. Después de la incubación con sustrato, se añade ácido sulfúrico 0,6 N para interrumpir la reacción y se obtiene la absorbancia o la densidad óptica (DO) espectrofotométricamente a 450 nm en un dispositivo de una sola longitud de onda. Se determinan las concentraciones de lactoferrina fecal por comparación con una curva patrón generada usando lactoferrina humana purificada.

5

a. Preparación de una curva patrón

Una solución madre de 1 mg/ml de lactoferrina humana purificada fabricada por Sigma Immunochemicals de St. Louis, Missouri, se preparó usando 10 mg de lactoferrina disuelta en 10 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril a un pH de 7,4. Se realizaron diluciones seriadas de dos veces de lactoferrina usando el intervalo de aproximadamente 6 a 100 ng/ml en Diluyente. Para el análisis, se ensayaron 0,1 ml de cada patrón por duplicado. Se determinaron las densidades ópticas (DO₄₅₀) y se representaron frente a la concentración de lactoferrina para generar curvas patrón. La porción lineal de la curva se determinó por análisis de regresión lineal usando el método Log-Log (Microsoft EXCEL, Microsoft R Office). La menor dilución de muestra que daba una DO₄₅₀ dentro de la porción lineal de la curva se usó para determinar la concentración de lactoferrina. La concentración final se obtuvo multiplicando la concentración por el factor de dilución.

15

b. Procedimiento de ensayo cuantitativo

Para evaluar la capacidad del ensayo cuantitativo para medir el nivel de lactoferrina fecal, se diluyeron dos muestras fecales recogidas con una diferencia de seis semanas de seis adultos femeninos y cinco masculinos, y después se les añadió lactoferrina a una concentración de 25 ng/ml. La "Lactoferrina estimada" que se determinó representa el nivel de lactoferrina determinada a partir de una curva patrón generada con el ELISA cuantitativo. El % de Variación representa la diferencia entre la cantidad "Real" usada para la adición a la muestra y la cantidad "Estimada". En estas condiciones, las variaciones oscilaban del 1,0% al 85,8% para sujetos femeninos y del 8,8% al 47,0% para sujetos masculinos. Los resultados mostraban un porcentaje de variación superior en adultos femeninos en comparación con adultos masculinos. Las muestras de heces que mostraban una variación mayor tenían niveles superiores de lactoferrina antes de la adición. Los resultados se ilustran en las Tablas XV y XVI a continuación.

30

TABLA XV

Muestras de heces de sujetos adultos femeninos con adiciones a una concentración final de 25 ng/ml

35

ID Paciente Nº	Lactoferrina Real (ng/ml)	Lactoferrina Estimada (ng/ml)	Variación (%)
1	25	15,4	38,4
2	25	22,9	8,5
3	25	21,8	12,7
4	25	28,4	13,5
5	25	16,2	35,3
6	25	15,8	37,0
7	25	35,5	41,8
8	25	46,5	85,8
9	25	27,7	10,8
10	25	32,3	29,1
11	25	26,1	4,3
12	25	25,3	1,0

55

60

65

ES 2 325 059 T3

TABLA XVI

Muestras de heces de sujetos adultos masculinos con adiciones a una concentración final de 25 ng/ml

ID Paciente N°	Lactoferrina Real (ng/ml)	Lactoferrina Estimada (ng/mg)	Variación (%)
1	25	21,9	12,4
2	25	21,2	15,0
3	25	20,9	16,3
4	25	21,4	14,4
5	25	20,8	16,8
6	25	22,8	8,8
7	25	28,9	15,5
8	25	29,4	17,4
9	25	36,7	47,0
10	25	19,5	21,9

Un segundo método para la adición era usar las mismas dos muestras de heces recogidas con una diferencia de seis semanas de seis adultos femeninos y cinco masculinos, diluirlas y añadirles lactoferrina a una concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$. La "Lactoferrina estimada" representa el nivel de lactoferrina determinado a partir de una curva patrón generada mediante el ELISA cuantitativo. El % de Variación representa la diferencia entre la cantidad "Real" usada para la adición a la muestra y el valor "Estimado". En estas condiciones, la variación oscilaba del 1,3% al 84,9% para sujetos femeninos y del 5,0% al 39,2% para sujetos masculinos. Los resultados eran similares a los obtenidos con muestras a las que se añadió lactoferrina 25 ng/ml, como se ha descrito anteriormente, mostrando un porcentaje de variación superior en adultos femeninos en comparación con adultos masculinos. Los resultados se ilustran en las Tablas XVII y XVIII a continuación.

TABLA XVII

Muestras de heces de sujetos adultos femeninos con adiciones a una concentración final de 4 $\mu\text{g/ml}$

ID Paciente N°	Lactoferrina Real ($\mu\text{g/ml}$)	Lactoferrina Estimada ($\mu\text{g/ml}$)	Variación (%)
1	4	4,5	11,3
2	4	4,6	15,3
3	4	5,3	33,4
4	4	4,9	21,4
5	4	3,5	11,5
6	4	3,4	14,7
7	4	5,3	32,7
8	4	6,7	67,6
9	4	5,5	38,6
10	4	5,8	44,9
11	4	5,8	43,9
12	4	7,4	84,9

ES 2 325 059 T3

TABLA XVIII

Muestras de heces de sujetos adultos masculinos con adiciones a una concentración final de 4 µg/ml

ID Paciente Nº	Lactoferrina Real (µg/ml)	Lactoferrina Estimada (µg/ml)	Variación (%)
1	4	4,7	17,5
2	4	4,6	14,4
3	4	4,2	5,0
4	4	5,6	39,2
5	4	4,2	5,9
6	4	4,7	18,5
7	4	4,7	16,5
8	4	5,5	37,9
9	4	5,3	33,6
10	4	4,3	6,6

3. Control usando el ELISA cuantitativo

Se usó el ELISA cuantitativo de la presente invención para realizar un seguimiento de los niveles de lactoferrina de un solo paciente que padecía colitis ulcerosa durante un “estallido” de enfermedad activa tras una remisión. El paciente mostraba niveles extremadamente elevados de lactoferrina (por ejemplo, 9749,37 µg/ml de heces) durante el nivel máximo de la enfermedad activa, disminuyendo los niveles rápidamente (por ejemplo, hasta 7,42 µg/ml de heces) después de una terapia farmacológica anti-inflamatoria. Los niveles se elevaron espectacularmente de nuevo durante una recaída y alcanzaron un nivel ligeramente superior al de personas de control sanas (por ejemplo, 11,06 µg/ml de heces) durante periodos de remisión. Por lo tanto, los niveles de lactoferrina determinados de acuerdo con el ELISA cuantitativo de la presente invención representaban con precisión la actividad de la enfermedad en respuesta a un tratamiento médico.

En resumen, la presente invención se refiere a métodos no invasivos para diferenciar entre el síndrome del intestino irritable y la enfermedad inflamatoria intestinal usando la presencia de lactoferrina fecal como un marcador de detección para leucocitos fecales y un kit usado para dicho método. La presente invención se refiere adicionalmente a inmunoensayos que utilizan anticuerpos específicos contra lactoferrina humana para la medición de lactoferrina endógena total en heces humanas. Todavía adicionalmente, la presente invención se refiere a un inmunoensayo cuantitativo para seguir los niveles de lactoferrina fecal en un paciente que tiene IBD.

Los inmunoensayos de la presente invención son sensibles, específicos y fáciles de realizar. Los ensayos detectan lactoferrina, una proteína estable que sirve como marcador de detección para leucocitos fecales y un indicador de inflamación intestinal, y los niveles cuantitativos de lactoferrina fecal para seguir a pacientes que tienen IBD. Los ensayos son rápidos y pueden completarse en aproximadamente setenta y cinco minutos. Los resultados de investigación respaldan el uso del ELISA cualitativo como una ayuda de diagnóstico *in vitro* para ayudar a distinguir a pacientes con IBD activa de aquellos con IBS activo. Los resultados de investigación respaldan adicionalmente el uso del ELISA cuantitativo para seguir los niveles de lactoferrina fecal en pacientes que tienen enfermedades inflamatorias.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método *in vitro* para distinguir el síndrome del intestino irritable de la enfermedad inflamatoria intestinal, comprendiendo el método: proporcionar una muestra fecal obtenida de una persona a diagnosticar; y determinar si dicha muestra contiene un nivel elevado de lactoferrina endógena, en el que si dicha muestra contiene un nivel elevado de lactoferrina endógena se excluyen diagnósticos de síndrome del intestino irritable y otras etiologías no inflamatorias.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además diluir dicha muestra fecal.
- 10 3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho paso de dilución de dicha muestra fecal comprende diluir dicha muestra con un factor de dilución de 1:400.
- 15 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha lactoferrina endógena comprende la lactoferrina total procedente de plasma y/o bilis y/o leucocitos y/o secreciones mucosas.
- 15 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha lactoferrina endógena se determina cualitativamente.
- 20 6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho paso de determinar si dicha muestra contiene un nivel elevado de lactoferrina endógena incluye poner en contacto dicha muestra con anticuerpos policlonales inmovilizados contra lactoferrina humana para generar una muestra tratada.
- 25 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho paso de determinar si dicha muestra contiene un nivel elevado de lactoferrina endógena incluye además poner en contacto dicha muestra tratada con anticuerpos policlonales ligados a enzimas para generar una muestra legible.
- 30 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho paso de determinar si dicha muestra contiene un nivel elevado de lactoferrina endógena incluye además determinar una densidad óptica de dicha muestra legible a 450 nm, en el que dicha densidad óptica se corresponde con un nivel de lactoferrina endógena en la muestra.
- 30 9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que si dicha densidad óptica de dicha muestra legible es superior a 0,200, dicha muestra fecal contiene un nivel elevado de lactoferrina endógena.
- 35 10. Un método *in vitro* para diferenciar el síndrome del intestino irritable de la enfermedad inflamatoria intestinal, que comprende un ensayo de diagnóstico que determina el nivel de lactoferrina endógena en una muestra, comprendiendo dicho ensayo: proporcionar una muestra fecal humana; diluir dicha muestra; poner en contacto dicha muestra con anticuerpos policlonales inmovilizados contra lactoferrina endógena para generar una muestra tratada; poner en contacto dicha muestra tratada con anticuerpos policlonales ligados a enzimas para generar una muestra legible; y determinar la densidad óptica de dicha muestra legible a 450 nm para determinar si dicha muestra legible contiene un nivel elevado de lactoferrina endógena en comparación con un valor de referencia para sujetos de control sanos; en el que si dicha muestra legible en dicho ensayo contiene un nivel elevado de lactoferrina endógena, se excluye un diagnóstico de síndrome del intestino irritable.
- 40 45 11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que si dicha densidad óptica de dicha muestra legible es superior a o igual a 0,200 en dicho ensayo, dicha muestra fecal contiene un nivel elevado de lactoferrina endógena en comparación con un valor de referencia para sujetos de control sanos.
- 45 50 12. El método de acuerdo con 10, en el que dicho ensayo es un inmunoensayo ligado a enzimas.
- 50 55 13. El método de acuerdo con 10, en el que dicha lactoferrina endógena comprende la lactoferrina total de plasma y/o bilis y/o leucocitos y/o secreciones mucosas.
- 55 60 65