

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 641**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/10 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.10.2017** **PCT/EP2017/076261**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.04.2018** **WO18069538**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2017** **E 17784283 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2024** **EP 3526340**

54 Título: **Un método de diagnóstico acompañante para uso en el tratamiento del síndrome del intestino irritable con intervenciones dietéticas o trasplante de microbiota fecal**

30 Prioridad:

14.10.2016 GB 201617519

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

24.10.2024

73 Titular/es:

GENETIC ANALYSIS AS (100.0%)
Postboks 243 Økern
0510 Oslo, NO

72 Inventor/es:

HEGGE, FINN TERJE;
CASEN, CHRISTINA;
VALEUR, JØRGEN;
RØSETH, ARNE y
SMÅSTUEN, MILADA CVANCAROVA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 983 641 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

Un método de diagnóstico acompañante para uso en el tratamiento del síndrome del intestino irritable con intervenciones dietéticas o trasplante de microbiota fecal

La presente invención proporciona un método de diagnóstico que puede usarse para determinar la probabilidad de que un sujeto con síndrome del intestino irritable (IBS) responda al tratamiento con una dieta de intervención para el IBS o un trasplante de microbiota fecal (FMT). En particular, el método puede usarse para predecir o determinar la probabilidad de una respuesta positiva del sujeto con IBS al tratamiento con una dieta de intervención para el IBS o FMT, especialmente para determinar la probabilidad de que la intervención dietética o FMT pueda tener un efecto positivo (es decir, beneficioso) sobre el tracto gastrointestinal del sujeto, específicamente la microbiota del tracto gastrointestinal, u otros síntomas o complicaciones del IBS (por ejemplo, reducción de la gravedad del mismo). De esta manera, se puede determinar si el IBS o una complicación o síntoma del IBS en un sujeto con IBS mejorará o no, o se evitará o retardará el desarrollo del IBS, o dicha complicación o síntoma del IBS, en dicho sujeto, después del tratamiento con una dieta de intervención para el IBS o FMT. El método de la invención permite así la identificación de pacientes con IBS que probablemente respondan clínicamente al tratamiento con una dieta de intervención para el IBS o FMT.

Sorprendentemente, se ha encontrado que, en sujetos con IBS que han demostrado responder al tratamiento con una dieta de intervención para el IBS o FMT, la abundancia de bacterias de ciertos grupos taxonómicos en muestras fecales puede ser mayor o menor que en sujetos no sintomáticos para IBS o sujetos con IBS que han demostrado no responder al tratamiento con una dieta de intervención para IBS o FMT. Por lo tanto, al comparar las cantidades de estas bacterias en muestras del tracto gastrointestinal de sujetos con IBS con las cantidades en muestras correspondientes de sujetos no sintomáticos de IBS, se pueden identificar sujetos con IBS que probablemente respondan al tratamiento con una dieta de intervención para IBS o FMT. De ello se deduce que, alternativa o adicionalmente, las cantidades de estas bacterias en muestras del tracto gastrointestinal de sujetos con IBS pueden compararse con valores de mediana para las cantidades de estas bacterias de muestras del tracto gastrointestinal de sujetos que previamente han demostrado responder a dichos tratamientos y valores de prueba mayores que un valor de corte de mediana para bacterias de grupos taxonómicos para los cuales quienes responden muestran cantidades mayores en comparación con los que no responden, o valores de prueba que son menores que un valor de corte de mediana para bacterias de grupos taxonómicos para los cuales quienes responden muestran cantidades disminuidas en comparación a los que no responden, son indicativos de sujetos con IBS que probablemente responderán al tratamiento con una dieta de intervención para el IBS o FMT. Por lo tanto, el método de la presente invención se basa en analizar la abundancia de ciertas bacterias en muestras del tracto gastrointestinal, por ejemplo mediante análisis de ácidos nucleicos, incluidas técnicas de secuencia de ácidos nucleicos o técnicas basadas en hibridación de sondas de oligonucleótidos.

El IBS es un trastorno gastrointestinal funcional definido en referencia a la presencia de una combinación de síntomas, específicamente dolor o malestar abdominal crónico y períodos prolongados de diarrea, estreñimiento o períodos alternos de ambos (diarrea por IBS (subtipo de diarrea IBS)), estreñimiento por IBS (subtipo de estreñimiento IBS) y mixto por IBS (subtipo IBS mixto). Un estándar de diagnóstico comúnmente aceptado son los criterios de Roma III, es decir, dolor o malestar abdominal recurrente ("malestar", que significa una sensación incómoda no descrita como dolor) al menos 3 días al mes en los últimos 3 meses asociado con dos o más de los siguientes: mejora con la defecación, inicio asociado con un cambio en la frecuencia de las deposiciones, inicio asociado con un cambio en la forma (aparición) de las heces. Algunos pacientes también experimentan hinchazón, distensión abdominal, espasmos, flatulencia, tenesmo y urgencia intestinal. A diferencia de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), el IBS es una afección idiopática de la que no se cree que sea desencadenada por un mecanismo patológico subyacente, pero frecuentemente se observan los mismos síntomas. El IBS puede ser diagnosticado a partir de la detección de los síntomas característicos, pero típicamente pueden requerirse pruebas más invasivas, como análisis de sangre e investigaciones endoscópicas, para descartar causas alternativas de los síntomas mostrados. La gravedad del IBS puede ser medida con la ya establecida Puntuación de Gravedad de los Síntomas del IBS (IBS-SSS; Francis CY, Aliment Pharmacol Ther. 1997 abril;11(2):395-402), que ha demostrado ser un cuestionario válido, significativo y reproducible con una alta sensibilidad para evaluar los cambios en la gravedad de los síntomas, especialmente en pacientes con IBS con síntomas moderados (Betz, C., et al, Z Gastroenterol., 2013, 51(10):1171-6).

Los tratamientos clínicamente eficaces para el IBS son limitados en número, pero incluyen la administración de antibióticos (por ejemplo, rifaximina), intervenciones dietéticas que incluyen dietas ricas en prebióticos (por ejemplo, dietas con alto contenido de oligosacáridos fermentables (FOS) (Slavin J. Nutrients. abril de 2013; 5(4): 1417-1435)), dietas restringidas en prebióticos (por ejemplo, dietas restringidas en FODMAP (oligosacáridos, disacáridos, monosacáridos y polioles fermentables) (Geary RB y et al., JCC 2008.09.004 8-14)), y dietas ricas en probióticos, y trasplantes de microbiota fecal (FMT; Kelly CR et al. Gastroenterology, julio de 2015; 149(1): 223-237). Otros tratamientos específicos incluyen linaclotida, en particular para el tratamiento sintomático del síndrome del intestino irritable con estreñimiento (IBS-C) de moderado a grave en adultos; y eluxadolina, en particular en el tratamiento de la diarrea y el dolor abdominal en personas con síndrome del

intestino irritable con predominio de diarrea (IBS-D). Además, dada la naturaleza idiopática del IBS, frecuentemente se observa que un tratamiento que es eficaz en un paciente no lo es en otro, incluso si cada paciente muestra esencialmente los mismos síntomas externos. Incluso un solo paciente puede responder en ciertos momentos pero no en otros.

El tracto gastrointestinal, también conocido como tracto digestivo o canal alimentario (y cuyos términos pueden usarse de manera intercambiable con tracto gastrointestinal), es la serie continua de órganos que comienza en la boca y termina en el ano. A lo largo de toda su longitud, el tracto gastrointestinal está colonizado por microorganismos de una variedad de diferentes especies. En conjunto, el contenido de microorganismos del tracto gastrointestinal es la microbiota del tracto gastrointestinal. Las cantidades relativas de los microorganismos constituyentes o grupos de ellos pueden ser consideradas un perfil de la microbiota. Por lo tanto, los perfiles de microbiota brindan información sobre la diversidad microbiana (es decir, el número de microbios taxonómicamente distintos o grupos taxonómicos distintos que están presentes) en el tracto gastrointestinal, además de proporcionar información sobre las cantidades relativas de los microbios o grupos de los mismos que están presentes.

Se cree que muchas enfermedades y afecciones, o etapas de las mismas, están asociadas con perturbaciones en la microbiota del tracto gastrointestinal o regiones del mismo. En algunos casos, la enfermedad o afección puede ser causada o exacerbada por el desplazamiento en el perfil de la microbiota del tracto gastrointestinal, o de regiones del mismo (es decir, las cantidades relativas de microbios constituyentes y la diversidad de esos microbios). En otros casos, la enfermedad o afección causa, o por algún mecanismo da como resultado, el despliegue de un perfil de la microbiota del tracto gastrointestinal que difiere del estado normal. En algunos contextos, esto puede incluso ser una respuesta adaptativa que intenta abordar el fenotipo patológico de la enfermedad o afección.

Ahora es un lugar común determinar e incluso cuantificar las cantidades relativas de microorganismos en una muestra del tracto gastrointestinal y utilizar dichos perfiles para diagnosticar enfermedades con referencia a perfiles específicos característicos de un estado de enfermedad o para descartar un diagnóstico con referencia a perfiles específicos característicos de un estado normal (por ejemplo documentos WO2012080754; WO2011043654). El documento WO2016156251 y publicaciones relacionadas de Casén et al (Alim. Pharmacol. Therap. (2015) 42: 71-83) describen métodos para determinar la probabilidad de disbiosis del tracto gastrointestinal utilizando perfiles de microbiota.

Sin embargo, no se ha sugerido que la abundancia de bacterias de ciertos grupos taxonómicos pueda ser indicativa de la probabilidad de que un sujeto con IBS responda al tratamiento con una dieta de intervención para el IBS o un trasplante de microbiota fecal (FMT).

Ahora hemos encontrado, sorprendentemente, que en sujetos con IBS que han demostrado responder al tratamiento con una dieta de intervención para IBS o FMT, la abundancia de bacterias de ciertos grupos taxonómicos en muestras fecales puede ser mayor o menor que en sujetos no sintomáticos para IBS o sujetos con IBS que han demostrado no responder al tratamiento con una dieta de intervención para IBS o FMT. Por lo tanto, al comparar las cantidades de estas bacterias en muestras del tracto gastrointestinal de sujetos con IBS con las cantidades en muestras correspondientes de sujetos no sintomáticos de IBS, se pueden identificar sujetos con IBS que probablemente respondan al tratamiento con una dieta de intervención para IBS o FMT y distinguirlos de aquellos que de modo improbable responderán. De ello se deduce que, alternativa o adicionalmente, las cantidades de estas bacterias en muestras del tracto gastrointestinal de sujetos con IBS pueden ser comparadas con valores de mediana para las cantidades de estas bacterias de muestras del tracto gastrointestinal de sujetos que previamente han demostrado responder a dichos tratamientos y valores de prueba mayores que un valor de corte de mediana para bacterias de grupos taxonómicos para los cuales quienes responden muestran cantidades mayores en comparación con los que no responden, o valores de prueba que son menores que un valor de corte de mediana para bacterias de grupos taxonómicos para los cuales quienes responden muestran cantidades disminuidas en comparación a los que no responden, son indicativos de sujetos con IBS que probablemente responderán al tratamiento con una dieta de intervención para el IBS o FMT.

Por tanto, como primer aspecto, la invención proporciona un método in vitro para determinar la probabilidad de que un sujeto con síndrome del intestino irritable (IBS) responda al tratamiento con una dieta de intervención para el IBS, en donde dicha dieta de intervención para el IBS es una dieta baja en FODMAP, comprendiendo dicho método

(i) para una muestra de prueba del tracto gastrointestinal de un sujeto con IBS de subtipo de diarrea o IBS de subtipo mixto que va a ser tratado con una dieta baja en FODMAP, determinar la cantidad de bacterias de al menos un grupo taxonómico seleccionado de

- *Acinetobacter junii*

- Bacteroides stercosis
- Bacteroides zoogloformans
- Dorea spp.
- Eubacterium siraeum
- 5 • Clostridium sp.
- Eubacterium halli
- Bacteroides spp.
- Firmicutes
- Veillonella spp., Helicobacter spp., y Clostridia; y
- 10 • Shigella spp. y Escherichia spp. y

(ii)(a) comparar la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico con un valor de referencia preparado a partir de al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto no sintomático para IBS, y determinar si la cantidad de dicha bacteria de dicho al menos un grupo taxonómico en dicha muestra de prueba difiere del valor de referencia o corresponde a él, en donde una cantidad de bacterias en los grupos taxonómicos Acinetobacter junii, Bacteroides stercosis, Bacteroides zoogloformans, Dorea spp., Eubacterium siraeum, Clostridium sp., o Eubacterium hallii que es mayor que los valores de referencia, o una cantidad de bacterias de los grupos taxonómicos Bacteroides spp., Firmicutes, Veillonella spp., Helicobacter spp. y Clostridia, o Shigella spp. y Escherichia spp. que es inferior a los valores de referencia, es indicativo de que el sujeto responderá a una dieta baja en FODMAP; y/o

(ii)(b) comparar la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico con un valor de corte que ha sido determinado como una cantidad mediana de dichas bacterias en al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto con IBS con dicho subtipo de IBS, del que previamente se ha demostrado que responde a dicho tratamiento y determinar si la cantidad de dicha bacteria de dicho al menos un grupo taxonómico en dicha muestra de prueba es mayor o menor que dicho valor de corte de mediana, en donde una cantidad de bacterias en los grupos taxonómicos Acinetobacter junii, Bacteroides stercosis, Bacteroides zoogloformans, Dorea spp., Eubacterium siraeum, Clostridium sp. o Eubacterium hallii que sea mayor que dicho valor de corte de mediana para dichas bacterias, o una cantidad de bacterias en los grupos taxonómicos Bacteroides spp., Firmicutes, Veillonella spp., Helicobacter spp. y Clostridia, o Shigella spp. y Escherichia spp. que sea menor que dicho valor de corte de mediana para dichas bacterias, es indicativo de que el sujeto responderá a una dieta baja en FODMAP.

Además, la invención se refiere a un método in vitro para determinar la probabilidad de que un sujeto con síndrome del intestino irritable (IBS) responda al tratamiento con una dieta de intervención para el IBS, en donde dicha dieta de intervención para el IBS es una dieta alta en FOS, comprendiendo dicho método

(i) determinar para una muestra de prueba del tracto gastrointestinal de un sujeto con IBS de subtipo de diarrea o IBS de subtipo mixto, que va a ser tratado con una dieta alta en FOS, la cantidad de bacterias de al menos un grupo taxonómico seleccionado de

- Eubacterium siraeum
- Firmicutes y
- Bacteroides spp. y Prevotella spp.; y

(ii)(a) comparar la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico con un valor de referencia preparado a partir de al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto no sintomático para IBS y determinar si la cantidad de dicha bacteria de dicho al menos un grupo taxonómico en dicha muestra de prueba difiere del valor de referencia o corresponde a él, en donde una cantidad de bacterias en los grupos taxonómicos Eubacterium siraeum, Firmicutes o Bacteroides spp. y Prevotella spp. que es mayor que los valores de referencia, es indicativo de que el sujeto responderá a una dieta alta en FOS; y/o

(ii)(b) comparar la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico con un valor de corte que ha sido determinado como una cantidad mediana de dichas bacterias en al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto con IBS con dicho subtipo de IBS, del que previamente se ha demostrado que responde a dicho tratamiento y determinar si la cantidad de dicha bacteria de dicho al menos un grupo taxonómico en dicha muestra de prueba es mayor o menor que dicho valor de corte de mediana, en donde una cantidad de bacterias en los grupos taxonómicos Eubacterium siraeum, Firmicutes o Bacteroides spp. y Prevotella spp. que es mayor que dicho valor de corte de mediana para dichas bacterias, es indicativo de que el sujeto responderá a una dieta alta en FOS.

La invención se refiere en un aspecto adicional a un método in vitro para determinar la probabilidad de que un sujeto con síndrome del intestino irritable (IBS) responda al tratamiento con una dieta de intervención para el IBS, en donde dicha dieta de intervención para el IBS es una dieta baja en FODMAP, comprendiendo dicho método

(i) determinar para una muestra de prueba del tracto gastrointestinal de un sujeto con IBS de subtipo de estreñimiento que va a ser tratado con una dieta baja en FODMAP, la cantidad de bacterias de al menos un grupo taxonómico seleccionado de

- 5
- *Clostridium methylpentosum*
 - *Eubacterium siraeum*
 - *Acinetobacter junii*, y
 - *Desulfitopora alkaliphila*; y
- 10 (ii)(a) comparar la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico con un valor de referencia preparado a partir de al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto no sintomático para IBS y determinar si la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico en dicha muestra de prueba difieren del valor de referencia o corresponden a él, en donde una cantidad de bacterias en los grupos taxonómicos *Clostridium methylpentosum* o *Eubacterium siraeum* que es mayor que
- 15 los valores de referencia, o una cantidad de bacterias en los grupos taxonómicos *Acinetobacter junii* o *Desulfitopora alkaliphila* que es inferior a los valores de referencia, es indicativo de que el sujeto responderá a una dieta baja en FODMAP; y/o
- (ii)(b) comparar la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico con un valor de corte que ha sido determinado como una cantidad mediana de dichas bacterias en al menos una muestra del tracto
- 20 gastrointestinal de al menos un sujeto con IBS con dicho subtipo de IBS, del que previamente se ha demostrado que responde a dicho tratamiento y determinar si la cantidad de dicha bacteria de dicho al menos un grupo taxonómico en dicha muestra de prueba es mayor o menor que dicho valor de corte de mediana, en donde una cantidad de bacterias en los grupos taxonómicos *Clostridium methylpentosum* o *Eubacterium siraeum* que es mayor que dicho valor de corte de mediana para dichas bacterias, o una cantidad de bacterias en los grupos
- 25 taxonómicos *Acinetobacter junii* o *Desulfitopora alkaliphila* que es menor que dicho valor de corte de mediana para dichas bacterias, es indicativo de que el sujeto responderá a una dieta baja en FODMAP.

En otro aspecto la invención se refiere a un método in vitro para determinar la probabilidad de que un sujeto con síndrome del intestino irritable (IBS) responda al tratamiento con un trasplante de microbiota fecal (FMT),

30 comprendiendo dicho método

(i) determinar para una muestra de prueba del tracto gastrointestinal de un sujeto con IBS de subtipo de diarrea que va a ser tratado con FMT, la cantidad de bacterias de al menos un grupo taxonómico seleccionado de

- 35
- *Clostridium* sp.
 - *Eubacterium hallii*, y
 - *Bacteroides* spp. y *Prevotella* spp.; y
- 40 (ii)(a) comparar la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico con un valor de referencia preparado a partir de al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto no sintomático para IBS, y determinar si la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico en dicha muestra de prueba difiere del valor de referencia o corresponde a él, en donde una cantidad de bacterias en el grupo taxonómico *Clostridium* sp., o *Eubacterium hallii* que es mayor que los valores de referencia, o una cantidad de bacterias del grupo taxonómico *Bacteroides* spp. y *Prevotella* spp., que es inferior
- 45 a los valores de referencia, es indicativo de que el sujeto responderá al FMT; y/o
- (ii)(b) comparar la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico con un valor de corte que ha sido determinado como una cantidad mediana de dichas bacterias en al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto con IBS con dicho subtipo de IBS, del que previamente se ha demostrado que responde a dicho tratamiento, y determinar si la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo
- 50 taxonómico en dicha muestra de prueba es mayor o menor que dicho valor de corte de mediana, en donde una cantidad de bacterias en el grupo taxonómico *Clostridium* sp., o *Eubacterium hallii* que es mayor que dicho valor de corte de mediana para dichas bacterias, o una cantidad de bacterias en el grupo taxonómico *Bacteroides* spp. y *Prevotella* spp., que es menor que dicho valor de corte de mediana para dichas bacterias, es indicativo de que el sujeto responderá al FMT.
- 55 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método in vitro para determinar la probabilidad de que un sujeto con síndrome del intestino irritable (IBS) responda al tratamiento con un trasplante de microbiota fecal (FMT), comprendiendo dicho método
- 60 (i) determinar para una muestra de prueba del tracto gastrointestinal de un sujeto con IBS de subtipo mixto que va a ser tratado con FMT, la cantidad de bacterias de al menos un grupo taxonómico seleccionado de

- 65
- *Clostridium* sp.
 - *Bacteroides* spp. y *Prevotella* spp., y
 - *Dialister invisus*; y

(ii)(a) comparar la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico con un valor de referencia preparado a partir de al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto no sintomático para IBS y determinar si la cantidad de dicha bacteria bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico en dicha muestra de prueba difiere de, o corresponde a, el valor de referencia, en donde una cantidad de bacterias en el grupo taxonómico *Clostridium* sp., que es mayor que los valores de referencia, o una cantidad de bacterias en los grupos taxonómicos *Bacteroides* spp. y *Prevotella* spp., y *Dialister* invisus que es inferior a los valores de referencia, es indicativo de que el sujeto responderá al FMT; y/o

(ii)(b) comparar la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico con un valor de corte que ha sido determinado como una cantidad mediana de dichas bacterias en al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto con IBS con dicho subtipo de IBS, del que previamente se ha demostrado que responde a dicho tratamiento, y determinar si la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico en dicha muestra de prueba es mayor o menor que dicho valor de corte de mediana, en donde una cantidad de bacterias en el grupo taxonómico *Clostridium* sp., que es mayor que dicho valor de corte de mediana para dichas bacterias, o una cantidad de bacterias en los grupos taxonómicos *Bacteroides* spp. y *Prevotella* spp., y *Dialister* invisus que es menor que dicho valor de corte de mediana para dichas bacterias, es indicativo de que el sujeto responderá al FMT.

La abreviatura "spp." es utilizada en el presente documento para indicar una pluralidad de especies. De acuerdo con la invención, una referencia a un grupo taxonómico que porta la abreviatura spp. es una referencia a un grupo que comprende una pluralidad de especies. Este puede considerarse como un grupo consistente en bacterias del mismo género. La abreviatura "sp." denota una sola especie.

"Determinar la probabilidad" puede incluir "determinar la probabilidad" o "verificar la probabilidad" o "evaluar la probabilidad". Como quedará claro a continuación, los resultados de estas evaluaciones pueden ser numéricos, gráficos o ilustrativos y, a su vez, cada uno puede ser semicuantitativo o cuantitativo.

También se verá que el método puede predecir si un sujeto con IBS responderá o no al tratamiento con una dieta de intervención para IBS o FMT, por ejemplo, si el IBS o sus síntomas o complicaciones en un sujeto con IBS mejorarán o es probable que mejoren, o si se retrasará o evitará el desarrollo del IBS, o dicha complicación o síntoma del IBS, o si es probable que se retrase o evite, después del tratamiento con una dieta de intervención para el IBS o FMT. El método también puede identificar, detectar, diagnosticar, clasificar o estratificar a pacientes con IBS que probablemente respondan al tratamiento con una dieta de intervención para IBS o FMT.

"Mejora", cuando es usado en relación con el IBS o las complicaciones y síntomas del mismo, es usado ampliamente en el presente documento para incluir cualquier cambio positivo o reducción en la gravedad del IBS o la complicación o síntoma en cuestión o indicador del mismo. Así se incluye, por ejemplo, una mejora en cualquier signo de IBS o complicación o síntoma del mismo, o en cualquier indicador clínicamente aceptado de IBS o complicación o síntoma del mismo en el sujeto (por ejemplo, dolor abdominal, diarrea, estreñimiento, hinchazón, distensión abdominal, espasmos, flatulencia, tenesmo y urgencia intestinal). La mejora no requiere necesariamente la erradicación total de la complicación o síntoma. La gravedad del IBS y sus síntomas y complicaciones pueden ser controlados mediante IBS-SSS. En ciertas realizaciones, se puede considerar que la mejora es una reducción del IBS-SSS de un sujeto de al menos aproximadamente un 10 %, por ejemplo al menos aproximadamente 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 % o 70 %. En ciertas realizaciones, se puede considerar que la mejora es una reducción del IBS-SSS de un sujeto en al menos aproximadamente 50 puntos, por ejemplo al menos aproximadamente 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 130, 140 o 150 puntos.

"Retraso", cuando es utilizado en relación con el IBS y sus complicaciones o síntomas, pretende incluir cualquier retraso, limitación o reducción en la aparición o desarrollo de cualquier efecto del IBS, una complicación o síntoma del mismo, o una o más indicaciones del mismo, o a la aparición o desarrollo del IBS, una complicación o síntoma del mismo, o una o más indicaciones del mismo, por ejemplo en relación con el IBS, complicación, síntoma o indicación del mismo antes del tratamiento.

Por el contrario, "prevención" se refiere a la prevención absoluta de la aparición o desarrollo de complicaciones o síntomas del IBS en sujetos con IBS que aún no presentan (o aún no han adquirido) la complicación o síntoma en cuestión. También se puede considerar que la prevención incluye una reducción del riesgo de que un paciente con IBS adquiera o desarrolle la complicación o síntoma en cuestión del IBS.

En ciertas realizaciones, la "mejora" o "retraso" de acuerdo con la invención, o los signos clínicos de la misma, pueden ser observados dentro de 14 días, por ejemplo, 10 días, 7 días, 5 días, 3 días, 2 días, 1 día 18 horas, 12 horas o 6 horas después de comenzar el tratamiento con una dieta de intervención para el IBS o FMT.

Puede darse el caso de que el estado de un sujeto con IBS como paciente que probablemente responda al tratamiento con una dieta de intervención para el IBS o FMT, pueda cambiar a lo largo del tiempo. Por ejemplo, los sujetos con IBS de los que se determina que probablemente responden, a lo largo del tiempo pueden ya no responder. De manera similar, los sujetos con IBS de los que se determina que probablemente no responden,

a lo largo del tiempo pueden responder. Estas transiciones entre estados de respuesta y no respuesta pueden ocurrir repetidamente. De acuerdo con ello, se pueden realizar los métodos de la invención repetidamente en relación con el mismo sujeto a lo largo del tiempo. Esto puede incluir el realizar los métodos de la invención durante o después del tratamiento de un sujeto con una dieta de intervención para el IBS o FMT, por ejemplo antes de comenzar un nuevo curso de tratamiento con una dieta de intervención para el IBS o FMT (para confirmar la probabilidad de respuesta). En otros casos, se pueden realizar los métodos de la invención en relación con un sujeto después de un período de tiempo apropiado, después de un resultado que muestra una probable falta de respuesta y/o un curso de tratamiento fallido con una dieta de intervención para el IBS o FMT. En tales realizaciones, los resultados recién generados del paciente también se pueden comparar (como se define en el presente documento) con resultados anteriores.

Por tanto, en ciertas realizaciones el sujeto con IBS es un sujeto que no ha recibido tratamiento con una dieta de intervención para IBS o FMT. En otras realizaciones, el sujeto con IBS es un sujeto que se somete a, o que ha recibido, tratamiento con una dieta de intervención para IBS o FMT. El sujeto con IBS puede ser un sujeto que respondió a dicho tratamiento o un sujeto que no respondió a dicho tratamiento. En aún otras realizaciones, el sujeto con IBS es un sujeto que ha sido previamente identificado como un sujeto que probablemente responderá al tratamiento con una dieta de intervención para IBS o FMT o un sujeto que ha sido previamente identificado como un sujeto que probablemente no responderá a dicho tratamiento.

En ciertas realizaciones, se determinan las cantidades de bacterias en al menos 2, 3, 4 o todos los grupos taxonómicos mencionados anteriormente y en el paso (ii)(a) se realiza una comparación con valores de referencia para dichos grupos taxonómicos preparados a partir de al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto no sintomático para IBS.

En ciertas realizaciones, se determinan las cantidades de bacterias en al menos 2, 3, 4 o todos los grupos taxonómicos mencionados anteriormente y en el paso (ii)(b) se realiza una comparación con los valores de corte para dichos grupos taxonómicos preparados de al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto con IBS con dicho subtipo de IBS y del que previamente se ha demostrado que responde a dicho tratamiento.

De acuerdo con la invención, el término "cantidades" de bacterias también puede ser expresado como "niveles", "abundancia" y similares. Estos términos se utilizan de manera intercambiable en este documento.

En realizaciones del paso (ii)(a) en el que se determinan las cantidades de bacterias de más de uno de los grupos taxonómicos citados anteriormente, los datos/información resultantes pueden ser considerados como un patrón o un perfil de los grupos seleccionados y en estas realizaciones se puede hacer la comparación con un patrón de referencia correspondiente (perfil) preparado a partir de al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto no sintomático para IBS. Una diferencia significativa (falta de correlación) entre el patrón de la muestra de prueba y el patrón de referencia es indicativa de que un sujeto con IBS responderá al tratamiento con una dieta de intervención para IBS o FMT. Sin querer estar atados a ninguna teoría, la extensión de cualquier diferencia puede ser indicativa del grado de respuesta. Asimismo, cuanto mayor sea la correlación, menos probable será que el sujeto responda al tratamiento.

En realizaciones del paso (ii)(b) en las que se determinan las cantidades de bacterias de más de uno de los grupos taxonómicos citados anteriormente, los datos/información resultantes pueden ser considerados como un patrón o un perfil de los grupos seleccionados y en estas realizaciones se puede hacer la comparación con un patrón de referencia correspondiente (perfil), preparado a partir de valores de corte de mediana para cada grupo taxonómico que han sido determinados a partir de al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto con IBS con el mismo subtipo de IBS, del que previamente se ha demostrado que responde a dicho tratamiento. En estas realizaciones, la comparación puede implicar determinar para uno o más de los grupos taxonómicos probados, si la cantidad de bacterias de dicho grupo taxonómico probado en dicha muestra de prueba es mayor o menor que dicho valor de corte de mediana.

En ciertas realizaciones más específicas de lo anterior, se puede atribuir una puntuación al perfil de prueba en función de (i) el número de casos en los que los valores de prueba para la cantidad de bacterias en los grupos taxonómicos mencionados anteriormente que están presentes en cantidades aumentadas en los sujetos con IBS con el mismo subtipo de IBS y que previamente han demostrado que responden al tratamiento con una dieta de intervención para IBS o FMT (según sea apropiado), en comparación con los sujetos con IBS que no responden del mismo subtipo de IBS, son mayores que los valores de corte de mediana para dichas bacterias en dichos sujetos con IBS que respondieron, y (ii) el número de casos en los que los valores de prueba para la cantidad de bacterias en los grupos taxonómicos mencionados anteriormente que están presentes en cantidades disminuidas en sujetos con IBS con el mismo IBS subtipo y de los que previamente se ha demostrado que responden al tratamiento con una dieta de intervención para el IBS o FMT (según sea apropiado), en comparación con sujetos con IBS que no responden con el mismo subtipo de IBS, son menores que los valores de corte de mediana para dichas bacterias, en dichos sujetos con IBS que responden. Después, se compara esta puntuación con el número de grupos taxonómicos evaluados en general y si la puntuación es

igual o superior al 30 %, por ejemplo igual o mayor al 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 %, del número de grupos taxonómicos probados, esto es indicativo de que el sujeto con IBS responderá al tratamiento con una dieta de intervención para el IBS o FMT.

- 5 En otras realizaciones más específicas de lo anterior, se puede atribuir una puntuación al perfil de prueba basándose en (i) el número de casos en los que los valores de prueba para la cantidad de bacterias en los grupos taxonómicos mencionados anteriormente que están presentes en cantidades aumentadas en los sujetos con IBS con el mismo subtipo de IBS y que previamente han demostrado que responden al tratamiento con una dieta de intervención para IBS o FMT (según sea apropiado), en comparación con los sujetos con IBS que no responden del mismo subtipo de IBS, son menos que los valores de corte de mediana para dichas bacterias en dichos sujetos con IBS que responden, y (ii) el número de casos en los que los valores de prueba para la cantidad de bacterias en los grupos taxonómicos mencionados anteriormente que están presentes en cantidades disminuidas en sujetos con IBS con el mismo subtipo de IBS y de los que previamente se ha demostrado que responden al tratamiento con una dieta de intervención para el IBS o FMT (según sea apropiado), en comparación con sujetos con IBS con el mismo subtipo de IBS que no responden, son mayores que los valores de corte de mediana para dichas bacterias en dichos sujetos con IBS que responden. Después, se compara esta puntuación con el número de grupos taxonómicos evaluados en general y si la puntuación es igual o superior al 30 %, por ejemplo igual o mayor al 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 %, del número de grupos taxonómicos probados, esto es indicativo de que el sujeto con IBS no responderá al tratamiento con una dieta de intervención para IBS o FMT.

Las divulgaciones anteriores que detallan qué grupos taxonómicos son indicadores de respuesta a una dieta de intervención para IBS o FMT cuando las cantidades de los mismos están presentes en el sujeto de prueba en o por encima o por debajo de los valores de corte de mediana, aplican *mutatis mutandis* a estas realizaciones.

De acuerdo con la invención, las cantidades de bacterias de los grupos taxonómicos seleccionados se pueden determinar junto con (junto con) las cantidades de bacterias no objetivo u otras bacterias que posteriormente se pueden determinar que son igualmente indicativas de la respuesta de un sujeto con IBS a una intervención de dieta para IBS o FMT. En otras palabras, se pueden obtener datos relacionados con la abundancia de las bacterias objetivo mencionadas anteriormente en una muestra del tracto gastrointestinal o ser proporcionados con datos relacionados con la abundancia de otras bacterias.

A este respecto, las cantidades de bacterias en los siguientes grupos taxonómicos pueden ser ciertas adicionalmente y comparadas con valores de referencia para muestras del tracto gastrointestinal de sujetos normobióticos o valores de corte de mediana para muestras del tracto gastrointestinal de sujetos con IBS, que previamente han demostrado responder a tratamiento con una dieta de intervención para el IBS o FMT (según sea apropiado): *Acinetobacter junii*, Firmicutes, *Shigella* spp. y *Escherichia* spp., *Bacteroides fragilis*, *Ruminiclostridium*, *Streptococcus*, Actinomycetales, Anaerotruncus, Clostridiales y Eubacterium.

En ciertos aspectos, los valores de prueba para *Acinetobacter junii*, Firmicutes, *Shigella* spp. y *Escherichia* spp., *Bacteroides fragilis*, *Ruminiclostridium*, *Streptococcus*, Actinomycetales, Anaerotruncus, Clostridiales y Eubacterium que difieren de los valores de referencia normobióticos son indicativos de que un sujeto con IBS responderá al tratamiento con una dieta baja en FODMAP. Por el contrario, los valores de prueba para *Acinetobacter junii*, Firmicutes, *Shigella* spp. y *Escherichia* spp., *Bacteroides fragilis*, *Ruminiclostridium*, *Streptococcus*, Actinomycetales, Anaerotruncus, Clostridiales y Eubacterium que corresponden a valores de referencia normobióticos son indicativos de que un sujeto con IBS no responderá al tratamiento con una dieta baja en FODMAP.

En ciertos aspectos, valores de prueba para *Acinetobacter junii*, *Bacteroides fragilis*, *Ruminiclostridium*, *Streptococcus* y Eubacterium que son mayores que los valores de referencia normobióticos, o que son mayores que los valores de corte de mediana de sujetos con IBS que previamente han demostrado responder al tratamiento con una dieta baja en FODMAP, son indicativos de que un sujeto con IBS responderá al tratamiento con una dieta baja en FODMAP.

En ciertos aspectos, los valores de prueba para Firmicutes, *Shigella* spp. y *Escherichia* spp., Actinomycetales, Anaerotruncus y Clostridiales que son inferiores a los valores de referencia normobióticos, o que son inferiores a los valores de corte de mediana de sujetos con IBS que previamente han demostrado responder al tratamiento con una dieta baja en FODMAP, son indicativos de que un sujeto con IBS responderá al tratamiento con una dieta baja en FODMAP.

En ciertos aspectos, valores de prueba para *Acinetobacter junii*, *Bacteroides fragilis*, *Ruminiclostridium*, *Streptococcus* y Eubacterium que son inferiores a los valores de corte de mediana de sujetos con IBS que previamente demostraron responder al tratamiento con una dieta baja en FODMAP, son indicativos de que un sujeto con IBS no responderá al tratamiento con una dieta baja en FODMAP.

En ciertos aspectos, los valores de prueba para Firmicutes, Shigella spp. y Escherichia spp., Actinomycetales, Anaerotruncus y Clostridiales, que son mayores que los valores de corte de mediana de sujetos con IBS que previamente demostraron responder al tratamiento con una dieta baja en FODMAP, son indicativos de que un sujeto con IBS no responderá al tratamiento con una dieta baja en FODMAP.

El tracto gastrointestinal, también conocido como tracto digestivo o canal alimentario (y cuyos términos pueden usarse de manera intercambiable con tracto gastrointestinal) es la serie continua de órganos que comienza en la boca y termina en el ano. En concreto esta secuencia está formada por la boca, la faringe, el esófago, el estómago, el duodeno, el intestino delgado, el intestino grueso y el ano. Estos órganos se pueden subdividir en el tracto gastrointestinal superior, que consiste en la boca, la faringe, el esófago, el estómago y el duodeno, y el tracto gastrointestinal inferior, que consiste en el yeyuno, el íleon (en conjunto, el intestino delgado), el ciego y el colon, el recto (junto con el intestino grueso) y el ano.

Una muestra del tracto gastrointestinal de uso de acuerdo con la invención puede incluir, pero no se limita a, cualquier fluido o sólido tomado del lumen o superficie del tracto gastrointestinal o cualquier muestra de cualquiera de los tejidos que forman los órganos del tracto gastrointestinal. Por lo tanto, la muestra puede ser cualquier contenido luminal del tracto gastrointestinal (por ejemplo, contenido estomacal, contenido intestinal, moco y heces/excremento, o combinaciones de los mismos), así como muestras obtenidas mecánicamente del tracto gastrointestinal, por ejemplo, mediante hisopo, enjuague, aspiración o raspado de una cavidad o superficie del tracto gastrointestinal o mediante biopsia de un tejido/órgano del tracto gastrointestinal. Se prefieren las muestras fecales. La muestra también se puede obtener de parte de un tejido/órgano del tracto gastrointestinal que se ha retirado quirúrgicamente. La muestra puede ser una porción del tejido/órgano extirpado. En realizaciones en las que la muestra es una muestra de un tejido/órgano del tracto gastrointestinal, la muestra puede comprender una parte de la mucosa, la submucosa, la muscular externa, la adventicia y/o la serosa del tejido/órgano del tracto gastrointestinal. Estas muestras de tejido pueden obtenerse mediante biopsia durante un procedimiento endoscópico. Preferiblemente, la muestra se obtiene del tracto gastrointestinal inferior, es decir, del yeyuno, el íleon, el ciego, el colon, el recto o el ano. Más preferiblemente la muestra es una muestra mucosa o luminal. Las muestras fecales pueden recolectarse mediante hisopo, enjuague, aspiración o raspado del recto o el ano o, más simplemente, la recolección de heces durante o después de la defecación.

La muestra puede ser utilizada de acuerdo con la invención en la forma en que se recuperó inicialmente. La muestra también puede haber soportado algún grado de manipulación, refinación o purificación antes de ser usada en los métodos de la invención. Por tanto, el término "muestra" también incluye preparaciones de la misma, por ejemplo materiales de partida relativamente puros o parcialmente purificados, tales como preparaciones semipuras de las muestras mencionadas anteriormente. El término "muestra" también incluye preparaciones de las muestras mencionadas anteriormente en las que el ARN, incluido el ARNr 16S, ha experimentado una transcripción inversa. Además se incluye el producto del cultivo microbiano de dicha muestra.

La purificación puede ser leve, por ejemplo, no superior a la concentración de los sólidos o células de la muestra hasta un volumen más pequeño, o la separación de células de parte o la totalidad del resto de la muestra. Las técnicas representativas de aislamiento de células son descritas en los documentos WO98/51693 y WO01/53525.

En ciertas realizaciones, de acuerdo con la invención se utiliza una preparación del ácido nucleico a partir de las muestras mencionadas anteriormente, preferiblemente una preparación en la que los ácidos nucleicos han sido marcados. Dichas preparaciones incluyen productos de transcripción inversa y/o productos de amplificación de dichas muestras o preparaciones de ácidos nucleicos de las mismas. Puede ser ventajoso que el ácido nucleico predominante de la preparación de ácido nucleico sea ADN. Estas preparaciones incluyen preparaciones de ácidos nucleicos relativamente puras o parcialmente purificadas.

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

El método puede incluir un paso de recolección de muestras y/o procesamiento y/o cultivo de muestras, en particular un paso de amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo amplificación genómica de ácidos nucleicos, en particular la amplificación de ácidos nucleicos que portan secuencias de nucleótidos características de un microorganismo o grupo de microorganismos.

A menos que el contexto lo indique de otro modo, el término "muestra correspondiente" es utilizado en el presente documento para referirse a muestras del mismo tipo que han sido de diferentes sujetos y/o en diferentes momentos, esencialmente de la misma manera, y en las que ha tenido lugar cualquier procesamiento o manipulación sustancial de las mismas, esencialmente de la misma manera.

Los métodos para determinar la cantidad de bacterias de un grupo taxonómico objetivo en una muestra del tracto gastrointestinal incluyen, pero no están limitados a, análisis de ácidos nucleicos (por ejemplo, aproximaciones de determinación de secuencia de ácidos nucleicos, aproximaciones basadas en sondas de hibridación de oligonucleótidos, aproximaciones de amplificación de ácidos nucleicos basada en cebador), anticuerpos u otras aproximaciones basadas en ligandos de afinidad específicos, aproximaciones proteómicas y metabólicas. Preferiblemente, el análisis de la muestra se realizará mediante análisis de secuencia de ácido nucleico y puede tomar la forma de una técnica de determinación de secuencia. El método de determinación de secuencia de dideoxinucleótidos de Sanger es una técnica bien conocida y ampliamente utilizada para determinar la secuencia de ácidos nucleicos. Sin embargo, más recientemente se han generalizado las llamadas aproximaciones de determinación de secuencia de "próxima generación" o "segunda generación" (en referencia al método de dideoxinucleótido de Sanger como aproximación de "primera generación"). Estas técnicas más nuevas se caracterizan por altos rendimientos, por ejemplo como consecuencia del uso de reacciones de determinación de secuencia paralelas, por ejemplo masivamente paralelas o mediante pasos que requieren menos tiempo. Diversos métodos de determinación de secuencia de alto rendimiento proporcionan determinación de secuencia de una sola molécula y emplean técnicas como pirodeterminación de secuencia, determinación de secuencia con terminador reversible, determinación de secuencia de sondas escindibles por ligación, determinación de secuencia de sondas no escindibles por ligación, nanobolas de ADN y determinación de secuencia de una sola molécula en tiempo real, por ejemplo determinación de secuencia basada en nanoporos.

El análisis de la secuencia de ácidos nucleicos también puede tomar preferiblemente la forma de una aproximación basada en una sonda de hibridación de oligonucleótidos, en el cual se confirma la presencia de una secuencia de nucleótidos objetivo detectando un evento de hibridación específico entre una sonda y su objetivo. En estas aproximaciones, la sonda de oligonucleótido frecuentemente es proporcionada como parte de un arreglo más amplio, por ejemplo un microarreglo de ácido nucleico inmovilizado. Preferiblemente, los conjuntos de sondas de oligonucleótidos y los métodos asociados de los documentos WO 2012/080754, WO 2011/043654, Vebø et al., Clin Vaccine Immunol, 2011, vol;18(8):1326-35, y Casén, C., et al, Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 42(1):71-83) y/o el Gamap^{MR} (Genetic Analysis AS, Noruega) pueden ser utilizados para preparar perfiles de microbiota de acuerdo con la presente invención.

Los datos generados usando los métodos mencionados anteriormente pueden ser analizados usando diversas técnicas, desde la representación visual más básica (por ejemplo, relacionada con la intensidad de la señal) hasta la manipulación de datos más compleja, que puede ser cuantificada y expresada matemáticamente, para determinar la cantidad de bacterias de un grupo taxonómico objetivo en la muestra del tracto gastrointestinal y/o para comparar los datos generados inicialmente o después de algún grado de procesamiento de datos de la muestra de prueba con los valores de referencia del sujeto no sintomático, y/o los valores de corte de sujetos con IBS de los que se ha demostrado que no responden al tratamiento con una dieta de intervención para el IBS o FMT (según sea apropiado). Convenientemente, los datos brutos así generados pueden ser manipulados mediante procesamiento de datos y métodos estadísticos, particularmente normalizando y estandarizando los datos. El experto sería consciente de las técnicas estadísticas adecuadas para el uso. Preferiblemente, la técnica estadística proporcionará un "valor P" como indicación de que la tendencia que se observa no es una tendencia aleatoria. Un resultado estadísticamente significativo, es decir, un resultado que no es atribuible a una variación aleatoria en comparación con su control, tendrá un valor de $P < 0.05$, preferiblemente < 0.01 , < 0.005 o < 0.001 . Meramente a modo de ejemplo, técnicas adecuadas para medir la significancia estadística en los métodos de la invención son ANOVA, prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon (MWW), prueba de Kruskal-Wallis y prueba de diferencias honestamente significativas (HSD) de Tukey. Los métodos de predicción incluyen métodos de análisis discriminante, regresión logística, modelado independiente suave de analogía de clase basado en análisis de componentes principales, análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales, etc. Muchos otros resultarían familiares para el experto. En algunas realizaciones podría ser apropiada una prueba de permutación, por ejemplo la descrita por Langsrud (2002, Journal of the Royal Statistical Society Serie D 51, 305-317) y en Vebø et al. (supra) and Casén, et al (supra). El análisis paralelo de las cantidades de bacterias en una muestra puede ser descrito como análisis de abundancia diferencial o detección diferencial de rasgos abundantes. Se puede utilizar cualquier técnica adecuada de acuerdo con la invención. A este respecto, están disponibles públicamente numerosas herramientas de software para tales análisis y la comparación de dichos análisis entre muestras de referencia y de prueba. Solamente a modo de ejemplo, se pueden citar DESeq, MEGAN, STAMP, metagenomeSeq, Myrna, RADs, metaDprof, mcaGUI y METAGENassist. En otras realizaciones, se pueden aplicar técnicas de aprendizaje supervisado a los datos. Simplemente a modo de ejemplo, se pueden mencionar las máquinas de vectores de soporte (SVM), las redes neuronales artificiales, el clasificador Bayes ingenuo, el aprendizaje de árboles de decisión, los algoritmos del vecino más cercano (kNN), los bosques aleatorios, la estadística bayesiana y el aprendizaje automático bayesiano.

De acuerdo con la invención, dichos valores de referencia (o patrones o perfiles) preparados a partir de al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto no sintomático para IBS, son valores (patrones/perfiles) preparados esencialmente de la misma manera que los valores de prueba /patrones/perfiles (la cantidad de bacterias en el grupo taxonómico objetivo, o patrones/perfiles del mismo), preferiblemente

usando el mismo equipo con los mismos ajustes y con las mismas condiciones experimentales, de una muestra del tracto gastrointestinal de esencialmente la misma parte del tracto gastrointestinal como la muestra del paciente de prueba (o viceversa). En otras palabras, una muestra correspondiente. En realizaciones convenientes, las muestras de prueba y de referencia son muestras fecales. En realizaciones adicionales, las muestras de referencia son obtenidas por los mismos medios y procesadas y almacenada esencialmente de la misma manera que las muestras de prueba (o viceversa). En realizaciones preferidas, el valor de referencia (patrón/perfil) se puede obtener de más de un (generalmente una cohorte de) sujeto(s) no sintomático(s) para IBS y dicho valor se presenta como un valor promedio (por ejemplo, media) o patrón/perfil modelo. Los rasgos de la preparación de dichos valores de corte de mediana (o patrones o perfiles) de al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto con IBS con el mismo subtipo de IBS que el sujeto de prueba del que previamente se ha demostrado que responde al tratamiento con una dieta de intervención para el IBS o FMT, deberían ser interpretados de manera análoga.

Un sujeto que no es sintomático para IBS es un sujeto al que no se le diagnosticaría IBS, en particular de acuerdo con los criterios de Roma III. Dicho sujeto puede mostrar uno o más síntomas para IBS, pero se ha descartado que el IBS sea una causa subyacente. Idealmente, un sujeto que no es sintomático para IBS es un sujeto en el cual la función del tracto gastrointestinal es esencialmente "normal"/"saludable", es decir, no disfuncional ni muestra ninguna evidencia de disfunción. En ciertas realizaciones, el sujeto no tiene disbiosis del tracto gastrointestinal, por ejemplo, según lo determinado por la prueba Gamap^{MR}. De manera más general, el sujeto puede ser un sujeto "normal" o "sano" esencialmente libre de enfermedades o dolencias graves u otras afecciones médicas, o al menos es un sujeto que no tiene síntomas observables o detectables de ninguna enfermedad o dolencia grave reconocida. En otras realizaciones, un sujeto normal o sano estará libre de toda enfermedad o dolencia u otras afecciones médicas, o al menos no tendrá síntomas observables o detectables de ninguna enfermedad o dolencia reconocida. Preferiblemente estas referencias a enfermedades, dolencias o condiciones médicas son referencias a una enfermedad, dolencia o condición médica del tracto gastrointestinal.

La comparación del valor de prueba para la cantidad de bacterias de un grupo taxonómico objetivo (o perfil/patrón del mismo, según sea apropiado) con el valor de referencia (o perfil/patrón) y la evaluación de cualquier diferencia (o falta de correspondencia) o correspondencia entre los dos puede ser un proceso semicuantitativo o cuantitativo. En el contexto de la presente invención, la correspondencia con un valor de referencia (o perfil/patrón del mismo) debe ser sustancialmente, por ejemplo, esencialmente, igual que (o similar a) un valor de referencia (o patrón/perfil del mismo). La diferencia debería ser interpretada de manera coherente con esto. Por lo tanto, un valor de prueba (o patrón/perfil) corresponde a la referencia si es sustancialmente el mismo, o si es similar o equivalente, o coincide o se ajusta a la referencia, por ejemplo es estadísticamente similar o estadísticamente equivalente. Por lo tanto, un valor de prueba (o patrón/perfil) difiere de la referencia si no es sustancialmente el mismo, o si no es similar o equivalente, o no coincide o no se ajusta a la referencia, por ejemplo no es estadísticamente similar ni estadísticamente equivalente. Por lo tanto, los pasos de comparación de los valores de prueba y de referencia (o patrón/perfil) y el determinar si es apropiado o no (o difieren) pueden ser realizados usando técnicas matemáticas o estadísticas (por ejemplo, usando modelos y algoritmos predictivos que se han preparado a partir de valores de referencia obtenidos anteriormente), y generalmente esto se implementará mediante software (es decir, se realizará utilizando un ordenador, es decir, virtualmente). Los métodos estadísticos o matemáticos para realizar tal comparación y determinación de correspondencia son bien conocidos y están ampliamente disponibles en la técnica. Así, también se entenderá claramente que no es necesario en cada caso preparar un valor de referencia o patrón o modelo (es decir, para cada prueba).

En una realización, la cantidad de bacterias de un grupo taxonómico objetivo (o perfil/patrón del mismo, según sea apropiado) en las muestras de prueba y de referencia puede ser expresada como una representación visual y en cuyo caso los valores de prueba y de referencia pueden ser comparados visualmente, o con medios análogos asistidos tecnológicamente, y luego estimarse la correspondencia (o diferencia) entre los valores de prueba y de referencia.

En otra realización, se puede analizar la correspondencia (o diferencia) entre una prueba y un valor de referencia (o patrón/perfil) aplicando dicho valor de prueba (o patrón/perfil) a un modelo matemático generado usando el(los) valor(es) de referencia (o patrón(es)/perfil(es)). Se puede utilizar un modelo matemático de este tipo para determinar si un valor de prueba se ajusta o coincide con un valor de referencia. Los métodos matemáticos para generar dicho modelo son bien conocidos y pueden, por ejemplo, ser preparados utilizando técnicas de regresión lineal. De acuerdo con ello, dicho análisis puede ser realizado usando un modelo predictivo de regresión lineal preparado a partir de una pluralidad de valores de referencia (o patrones/perfiles).

En realizaciones en las que se determinan cantidades de bacterias de dos grupos taxonómicos, la correspondencia entre una prueba y un patrón/perfil de referencia es analizada mediante la representación de los patrones de prueba y de referencia como puntos únicos en un sistema de coordenadas cartesiano bidimensional, teniendo dichos puntos coordenadas que son los valores para las cantidades de bacterias en los dos grupos taxonómicos objetivo, por ejemplo, como un diagrama de dispersión 2D (gráfico), pero esto no

es esencial. La colocación de los puntos de datos sugiere que el sujeto no responderá al tratamiento. La falta de colocación sugiere que el sujeto responderá al tratamiento.

Se puede considerar que ocurre la colocación del punto de datos de prueba con un punto de datos de referencia, si el punto de datos de prueba está dentro de un área definida que tiene el punto de datos de referencia en su centro y tiene una longitud y un ancho (dimensiones x e y) que atraviesan dicho punto central, que es igual a o menor que el 50 % del valor de la coordenada relevante en el punto de datos de referencia (es decir, la cantidad de bacterias en el grupo taxonómico objetivo que está en la misma dimensión que la longitud o el ancho del área). En realizaciones adicionales, dicha longitud y/o ancho del área es igual a o menor que 40 %, por ejemplo igual a o inferior a 30 %, 20 %, 10 % o 2 % de la coordenada relevante.

En otras realizaciones en las que se determinan cantidades de bacterias de tres grupos taxonómicos, la correspondencia entre una prueba y un patrón/perfil de referencia se analiza mediante la representación de los patrones de prueba y de referencia como puntos únicos en el espacio euclidiano que tienen coordenadas que son los valores de las cantidades de bacterias en los tres grupos taxonómicos objetivo, por ejemplo, como un diagrama de dispersión 3D (gráfico), pero esto no es esencial. La colocación de los puntos de datos sugiere que el sujeto no responderá al tratamiento. La falta de colocación sugiere que el sujeto responderá al tratamiento.

Se puede considerar que ocurre la colocación del punto de datos de prueba con un punto de datos de referencia, si el punto de datos de prueba está dentro de un volumen euclidiano definido por tener el punto de datos de referencia en su centro y bordes (o límites) que corren en las mismas tres dimensiones que las tres coordenadas del punto de datos de referencia, en donde la longitud de dichos bordes es igual a o menor que el 50 % de la coordenada relevante que constituye el punto de datos de referencia (es decir, la cantidad de bacterias en el grupo taxonómico objetivo que está en la misma dimensión que el borde en cuestión). En realizaciones adicionales, dicha longitud del borde es igual a o menor que 40 %, por ejemplo igual a o inferior a un 30 %, 20 %, 10 % o 2 % de la coordenada relevante.

En ciertas realizaciones, se compara el único punto de datos de prueba con una pluralidad de puntos de datos de referencia y se puede considerar que ocurre la colocación, si el punto de datos de prueba está sustancialmente, por ejemplo esencialmente, en o dentro de los límites más externos formados por el grupo de puntos de referencia. Esto puede ser determinado mediante cualquier técnica o algoritmo de análisis de grupos conveniente (que también puede denominarse algoritmo de grupos), que puede ser 2D o 3D, por ejemplo, análisis jerárquico de grupos que utiliza la distancia euclidiana como medida de distancia y un método de construcción de árbol "promedio".

Se puede considerar que ocurre correspondencia entre una prueba única y un valor único de referencia, si el valor de la prueba es igual a o menor que una desviación positiva o negativa del 25 % del valor de referencia. En realizaciones adicionales, dicha desviación positiva o negativa es igual a o menor que el 20 %, por ejemplo igual a o menor que 15 %, 10 %, 5 % o 1 %.

Un sujeto con IBS (sujeto con IBS, sujeto que padece IBS) es un sujeto al que se le ha diagnosticado IBS, en particular de acuerdo con los criterios de Roma III. A los sujetos con IBS pueden asignarse subtipos sobre la base de su síntoma digestivo predominante, como diarrea, estreñimiento o subtipos mixtos. La gravedad de los síntomas del IBS del sujeto puede ser expresada en forma de puntuación de gravedad de los síntomas del IBS (IBS-SSS; como se define en Francis CY, Aliment Pharmacol Ther. abril de 1997; 11(2):395-402). La puntuación máxima alcanzable de este inventario es 500 puntos, lo que permite clasificar la gravedad de los síntomas de la siguiente manera: leve (75-175 puntos), moderada (175-300 puntos) y grave (>300 puntos). De acuerdo con la invención, puede definirse un sujeto con IBS que responde a una intervención (por ejemplo, una intervención dietética o FMT) como un sujeto en el que hay al menos un 30 %, por ejemplo al menos un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 % o 70 %, en particular al menos un 50 %, de reducción del IBS-SSS total desde la línea base, hasta después de la intervención. Alternativamente, de acuerdo con la invención, un sujeto con IBS que responde a una intervención (por ejemplo, una intervención dietética o FMT) puede ser definido como un sujeto en donde hay al menos 50, por ejemplo al menos 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 o 150, en particular al menos 100 puntos de reducción en el IBS-SSS total desde la línea base hasta después de la intervención.

Los valores de corte de mediana se derivan de una pluralidad de valores para la cantidad de bacterias en un grupo taxonómico elegido de la invención como se mencionó anteriormente, de al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto con IBS (del mismo subtipo de IBS que el sujeto de la prueba, si es apropiado), del que se sabe que responde al tratamiento con una dieta de intervención para el IBS o FMT, según sea apropiado, como se define en el presente documento. Preferiblemente, los valores de corte de mediana se derivan de valores obtenidos de una pluralidad de muestras de al menos un sujeto con IBS (del mismo subtipo de IBS que el sujeto de prueba, si es apropiado), del que se sabe que responde al tratamiento con una dieta de intervención para IBS o FMT, según sea apropiado, según se define en este documento. Preferiblemente, los valores de corte de mediana se derivan de valores obtenidos de al menos una muestra de

una pluralidad de sujetos con IBS (del mismo subtipo de IBS que el sujeto de prueba, si es apropiado) de los que se sabe que responden al tratamiento con una dieta de intervención para IBS o FMT, según sea apropiado, según se define en este documento. Lo más preferiblemente, los valores de corte de mediana se derivan de valores obtenidos de una pluralidad de muestras de una pluralidad de sujetos con IBS (del mismo subtipo de IBS que el sujeto de prueba, si es apropiado) de los que se sabe que responden al tratamiento con una dieta de intervención para IBS o FMT, según sea apropiado, según se define en este documento.

La comparación entre los valores de prueba y los valores de corte de mediana puede ser lograda por cualquier medio conveniente. En ciertas realizaciones, la comparación implicará pasos para determinar si el valor de prueba es o no estadísticamente significativamente mayor (o menor) que el valor de corte de mediana. Por tanto, la comparación implicará técnicas matemáticas (estadísticas), y esto generalmente se implementará mediante software (es decir, se realizará utilizando un ordenador, es decir, virtualmente). Los métodos estadísticos o matemáticos para realizar tales comparaciones y determinaciones son bien conocidos y están ampliamente disponibles en la técnica, por ejemplo los descritos anteriormente. Por lo tanto, también se entenderá claramente que no es necesario en cada caso preparar un valor de corte de mediana o patrón o modelo (es decir, para cada prueba).

En otras realizaciones en las que se determinan las cantidades de bacterias de más de un grupo taxonómico, se puede considerar que un patrón/perfil de prueba corresponde a un patrón/perfil de referencia si 2 o más, por ejemplo todos, los valores de prueba son iguales a o menores que el 25 % de desviación positiva o negativa de los valores de referencia correspondientes. En realizaciones adicionales, dicha desviación positiva o negativa es igual a o menor que el 20 %, por ejemplo igual a o menor que 15 %, 10 %, 5 % o 1 %.

Una dieta de intervención para el IBS puede ser cualquier dieta que pueda o de la que se haya demostrado que (i) trata (mejora) el IBS o un síntoma o complicación del mismo en un sujeto con IBS, es decir, que tiene un efecto positivo (beneficioso) en el tracto gastrointestinal del un sujeto con IBS, específicamente la microbiota del tracto gastrointestinal, u otros síntomas o complicaciones del IBS (por ejemplo, reduciendo su gravedad) o (ii) previene o retrasa el desarrollo del IBS o una complicación o síntoma del mismo en un sujeto. Esto incluiría dietas ricas en prebióticos, dietas restringidas en prebióticos y dietas ricas en probióticos. Las dietas evaluadas en la invención son bajas en FODMAP (también denominadas en el presente documento FODMAP restringido) y altas en FOS (también denominadas ricas en FOS). Estas dietas son descritas y definidas en Slavin J. Nutrients. Abril de 2013; 5(4): 1417-1435 y Gearry RB et al., JCC 2008.09.004 8-14) El experto reconocería dichas dietas inmediatamente y sería capaz de concebirlas sin una carga indebida de su conocimiento común o consultando la literatura, por ejemplo, Slavin y Gearry, supra.

El trasplante de microbiota fecal (también denominado infusión de probióticos humanos, bacterioterapia fecal, terapia de restauración de la microbiota, transfusión fecal, trasplante fecal, trasplante de heces y enema fecal) se refiere a un procedimiento en el que se recolecta materia fecal de un donante seleccionado y se administra a un receptor, después de cierto grado de procesamiento de la muestra. En algunas técnicas, la materia fecal es mezclada con solución salina u otra solución farmacéuticamente aceptable, se cuele y se coloca en un paciente mediante colonoscopia, endoscopia, sigmoidoscopia o enema. En otras técnicas, la materia sólida es separada de la materia fecal y se liofiliza antes de su administración mediante colonoscopia, endoscopia, sigmoidoscopia, enema, catéter rectal o por vía oral. Preferiblemente el FMT es como se describe en Francis CY, Aliment Pharmacol Ther. Abril de 1997; 11(2):395-402 o Betz, C., et al, Z Gastroenterol., 2013, 51(10):1171-6).

El sujeto puede ser cualquier sujeto humano o animal no humano, pero más particularmente puede ser un vertebrado, por ejemplo un mamífero, incluyendo ganado y animales de compañía. Preferiblemente el sujeto es un ser humano, en cuyo caso el término "paciente" puede ser usado de manera intercambiable con el término "sujeto". El sujeto puede ser de cualquier edad, por ejemplo un bebé, un niño, un joven, un adolescente o un adulto, preferiblemente un adulto. En humanos se considera adulto aquel que tiene al menos 16 años y bebé hasta los 2 años. En ciertas realizaciones el sujeto será un bebé, en otras será un niño o un adulto. Un sujeto (o paciente) con IBS está con un sujeto (o paciente) con IBS y los términos pueden ser usados de manera intercambiable en el presente documento. Se puede determinar que el sujeto tiene (se le diagnostica) IBS o un subtipo del mismo, aplicando los criterios de Roma III como se describió anteriormente. Por lo tanto, el método de la invención puede incluir un paso en el que se determina que el sujeto de prueba tiene (se le diagnostica) IBS.

El método de este aspecto de la invención es un método *in vitro*, en la medida en que es realizado en una muestra que ha sido obtenida o aislada del tracto gastrointestinal de un sujeto. En otras palabras, el método no es realizado *in vivo*, o no es realizado sobre el cuerpo del sujeto.

Por tanto, en este aspecto, el tratamiento del paciente (es decir, el paso de tratar al sujeto con una dieta de intervención para el IBS o FMT) no forma parte del método. Así, por ejemplo, las referencias a los resultados después del tratamiento son referencias intelectuales a posibles resultados, y el paso de tratar al sujeto con una dieta de intervención para el IBS, o administrar FMT, no forma parte de los métodos de este aspecto de la

invención. Sin embargo, puede darse el caso de que dichos tratamientos sean administrados al paciente siguiendo el método descrito en este aspecto.

5 Por tanto, en un aspecto particular adicional, un método de la invención puede comprender además administrar una dieta de intervención para el IBS o FMT al sujeto, si se determina que es probable que el sujeto responda a la misma (y a la inversa, no administrar una dieta de intervención para el IBS o FMT al sujeto si el se determina que no es probable que responda).

10 La palabra "correspondiente" se utiliza para transmitir el concepto de que el sujeto al que se aplica el término es el mismo que otra instancia de ese sujeto. Así, los rasgos esenciales que definen a ese sujeto son compartidos por el otro sujeto, aunque los detalles precisos puedan ser únicos. Los términos alternativos podrían ser "coincidente", "análogo", "concordante", "equivalente" o "igual que".

15 En ciertas realizaciones, la "mejoría" o "retraso" de acuerdo con la invención, o los signos clínicos de la misma, pueden ser observados dentro de 14 días, por ejemplo, 10 días, 7 días, 5 días, 3 días, 2 días, 1 día, 18 horas, 12 horas o 6 horas, después de iniciar el tratamiento con la dieta de intervención del IBS o FMT según sea apropiado.

20 La Figura 1 muestra un gráfico de clasificación en 3D utilizando los resultados de *Bacteroides* spp., *Acinetobacter junii* y *Firmicutes* del Estudio 1 del Ejemplo 1 (respuesta a una dieta baja en FODMAP en el subgrupo de diarrea del IBS). Gris claro = quienes responden, Gris oscuro = quienes no responden.

25 La Figura 2 muestra un gráfico de clasificación en 2D utilizando los resultados de *Acinetobacter junii* y *Firmicutes* del Estudio 1 del Ejemplo 1 (respuesta a una dieta baja en FODMAP en el subgrupo de diarrea del IBS). Gris claro=quienes responden, Gris oscuro=quienes no responden.

30 La Figura 3 muestra un gráfico de clasificación en 2D utilizando los resultados de *Acinetobacter junii* y *Bacteroides* spp. del Estudio 1 del Ejemplo 1 (respuesta a una dieta baja en FODMAP en el subgrupo de diarrea del IBS). Gris claro=quienes responden, Gris oscuro=quienes no responden.

La Figura 4 muestra un gráfico de clasificación en 2D utilizando los resultados de *Firmicutes* y *Bacteroides* spp. del Ejemplo 1, Estudio 1 (respuesta a una dieta baja en FODMAP en el subgrupo de diarrea del IBS). Gris claro=quienes responden, Gris oscuro=quienes no responden.

35 La Figura 5 muestra un gráfico de clasificación en 3D utilizando los resultados de *Acinetobacter junii*, *Costridium methylpentosum* y *Desulfitipora alkaliphila* del Ejemplo 1 Estudio 1 (respuesta a la dieta baja en FODMAP en el subgrupo de IBS) Gris claro = quienes responden, Gris oscuro = quienes no responden (precisión del 80 %).

40 La Figura 6 muestra un gráfico de clasificación en 2D utilizando los resultados de *Acinetobacter junii* y *Desulfitipora alkaliphil* del Ejemplo 1 Estudio 1 (respuesta a una dieta baja en FODMAP en el subgrupo de estreñimiento de IBS). Gris claro=quienes responden, Gris oscuro=quienes no responden.

45 La Figura 7 muestra un gráfico de clasificación en 2D utilizando los resultados de *Acinetobacter junii* y *Clostridium methylpentosum* del Ejemplo 1 Estudio 1 (respuesta a una dieta baja en FODMAP en el subgrupo de estreñimiento de IBS). Gris claro=quienes responden, Gris oscuro=quienes no responden.

50 La Figura 8 muestra un gráfico de clasificación en 2D utilizando los resultados de *Desulfitipora alkaliphila* y *Clostridium methylpentosum* del Ejemplo 1 Estudio 1 (respuesta a una dieta baja en FODMAP en el subgrupo de estreñimiento de IBS). Gris claro=quienes responden, Gris oscuro=quienes no responden.

55 La Figura 9 muestra un gráfico de clasificación en 3D utilizando resultados de *Shigella* spp. y *Escherichia* spp., *Dorea* spp. y *Eubacterium siraeum* del Estudio 2 del Ejemplo 1 (respuesta a una dieta baja en FODMAP en el subgrupo de diarrea del IBS). Gris claro=quienes responden, Gris oscuro=quienes no responden (precisión 90,9 %).

La Figura 10 muestra un gráfico de clasificación en 2D utilizando *Dorea* spp. y *Shigella* spp. y *Escherichia* spp. resultados del Estudio 2 del Ejemplo 1 (respuesta a una dieta baja en FODMAP en el subgrupo de diarrea del IBS). Gris claro=quienes responden, Gris oscuro=quienes no responden.

60 La Figura 11 muestra un gráfico de clasificación en 2D utilizando resultados de *Eubacterium siraeum* y *Shigella* spp. y *Escherichia* spp. del Estudio 2 del Ejemplo 1 (respuesta a una dieta baja en FODMAP en el subgrupo de diarrea del IBS). Gris claro=quienes responden, Gris oscuro=quienes no responden.

65 La Figura 12 muestra un gráfico de clasificación en 2D utilizando resultados de *Eubacterium siraeum* y *Dorea* spp. del Ejemplo 1 Estudio 2 (respuesta a FODMAP en el subgrupo de diarrea de IBS). Gris claro=quienes responden, Gris oscuro=quienes no responden.

La Figura 13 muestra un gráfico de clasificación en 3D utilizando resultados de *Eubacterium siraeum*, Firmicutes y *Bacteroides* spp. y *Prevotella* spp. del Estudio 2 del Ejemplo 1 (respuesta a una dieta alta en FOS en el subgrupo de diarrea del IBS). Gris claro=quienes responden, Gris oscuro=quienes no responden (precisión 100 %).

La Figura 14 muestra un gráfico de clasificación en 2D utilizando resultados de Firmicutes y *Bacteroides* spp. y *Prevotella* spp. del Estudio 2 del Ejemplo 1 (respuesta a una dieta alta en FOS en el subgrupo de diarrea del IBS). Gris claro=quienes responden, Gris oscuro=quienes no responden.

La Figura 15 muestra un gráfico de clasificación en 2D utilizando resultados de *Eubacterium siraeum* y *Bacteroides* spp. y *Prevotella* spp. del Estudio 2 del Ejemplo 1 (respuesta a una dieta alta en FOS en el subgrupo de diarrea del IBS). Gris claro=quienes responden, Gris oscuro=quienes no responden.

La Figura 16 muestra un gráfico de clasificación en 2D utilizando los resultados de *Eubacterium siraeum* y Firmicutes del Estudio 2 del Ejemplo 1 (respuesta a una dieta alta en FOS en el subgrupo de diarrea del IBS). Gris claro=quienes responden, Gris oscuro=quienes no responden. Subgrupo de diarrea

La Figura 17 muestra un gráfico de clasificación en 3D utilizando resultados de *Bacteroides* spp. y *Prevotella* spp., *Eubacterium hallii* y *Clostridium* sp. del Ejemplo 1 Estudio 3 (respuesta a FMT en el subgrupo de diarrea de IBS). Gris claro=quienes responden, Gris oscuro=quienes no responden (precisión 100 %).

La Figura 18 muestra un gráfico de clasificación en 2D utilizando resultados de *Bacteroides* spp. y *Prevotella* spp., y *Eubacterium hallii* del Ejemplo 1 Estudio 3 (respuesta a FMT en el subgrupo de diarrea del IBS). Gris claro=quienes responden, Gris oscuro=quienes no responden.

La Figura 19 muestra un gráfico de clasificación en 2D utilizando resultados de *Bacteroides* spp. y *Prevotella*, y *Clostridium* sp. del Ejemplo 1 Estudio 3 (respuesta a FMT en el subgrupo de diarrea de IBS). Gris claro=quienes responden, Gris oscuro=quienes no responden.

La Figura 20 muestra un gráfico de clasificación en 2D utilizando resultados de *Eubacterium hallii* y *Clostridium* sp. del Ejemplo 1 Estudio 3 (respuesta a FMT en el subgrupo de diarrea de IBS). Gris claro=quienes responden, Gris oscuro=quienes no responden.

La Figura 21 muestra un PCA de tres factores de la composición de la microbiota intestinal, según lo evaluado por la Prueba de Disbiosis GAmap^{MR}, en pacientes con IBS clasificados como quienes responden (círculos; n = 32) y quienes no responden (triángulos; n = 29) a una dieta restringida en FODMAP de 4 semanas, como se describe en el Ejemplo 2.

La Figura 22 muestra la asociación entre el índice de respuesta, basado en los resultados de la composición de la microbiota intestinal, y la respuesta a los síntomas, evaluada como porcentaje de reducción en IBS-SSS desde los valores de línea base, como se describe en el Ejemplo 2 (quienes responden (círculos; n = 32); quienes no responden (triángulos; n = 29)) Las variables están significativamente correlacionadas ($\rho = 0,39$, $p < 0,001$).

Ejemplo 1 - Identificación de grupos taxonómicos bacterianos capaces de discriminar pacientes con IBS que responden a una dieta baja en FODMAP, una dieta alta en FOS o FMT de pacientes que no responden

Métodos

Se realizaron estudios clínicos para identificar grupos taxonómicos dentro de la microbiota del tracto gastrointestinal que pueden servir como marcadores para pacientes con IBS que responden a una dieta baja en FODMAP (como se define en Gearry RB y otros, JCC 2008.09.004 8-14), una dieta alta en FOS (como se define en Slavin J. Nutrients. Abril de 2013; 5(4): 1417-1435) FMT (como se define en Francis CY, Aliment Pharmacol Ther. abril de 1997;11(2):395-402).

Los pacientes fueron reclutados de acuerdo con los criterios ROMA III para el diagnóstico del IBS. A los pacientes se asignaron subtipos de IBS sobre la base de su síntoma predominante en los siguientes subtipos: Diarrea, Estreñimiento o Mixto. Se prepararon perfiles de microbiota a partir de muestras fecales de cada paciente utilizando la prueba de disbiosis GAmap^{MR} (Genetic Analysis AS, Oslo, Noruega) antes del tratamiento y después de 3 a 6 semanas en los estudios de intervención de dieta y después de 1 y 3 semanas en los estudios de FMT. En ese momento, los pacientes proporcionaron una puntuación de gravedad de los síntomas del IBS (IBS-SSS; como se define en Francis CY, Aliment Pharmacol Ther. 1997 abril;11(2):395-402), se registra y esta puntuación es utilizada para definir a los que responden/no responden en función de los cambios en la puntuación.

La prueba GAmap^{MR} se basa en técnicas convencionales de biología molecular, que comprenden la homogeneización y la alteración mecánica de células bacterianas de muestras fecales humanas; extracción automatizada de ADNg bacteriano total mediante perlas magnéticas; amplificación de ADN por PCR de ARNr 16S que cubre V3-V9; etiquetado de sonda mediante extensión de un solo nucleótido; hibridación con sondas complementarias acopladas a perlas magnéticas; y detección de señales utilizando el analizador BioCode 1000A 128-Plex (Applied BioCode, Santa Fe Springs, CA, EE. UU.). GAmapTM consta de 54 sondas de ADN que se dirigen a ≥ 300 bacterias en diferentes niveles taxonómicos y que han sido seleccionadas sobre la base de la capacidad de distinguir entre pacientes con IBS y pacientes sanos (es decir, pacientes no sintomáticos para IBS). El modelo evalúa mediante algoritmos el relativo, proporciona así un perfil de la microbiota en la muestra y puede determinar posibles desviaciones clínicamente relevantes en el microbioma de la normobiosis, es decir, la disbiosis (Casén, C., et al, *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 42(1):71-83).

Se realizó un análisis discriminante paso a paso sobre los resultados de Gamap^{MR}, utilizando los valores de la sonda bacteriana previos a la intervención (línea de base) como variables candidatas para caracterizar a los que responden y no responden a la intervención (baja en FODMAP, alta en FOS, FMT). El procedimiento seleccionó las bacterias candidatas que mejor separaban a los pacientes que respondieron de los que no respondieron. Se definió que un paciente que responde tenía al menos una reducción del 50 % (intervenciones dietéticas) o una reducción de al menos 100 puntos (FMT) en la puntuación total del IBS desde la línea base hasta después de la intervención. Luego, se utilizaron las variables seleccionadas en una función discriminante lineal de Fisher, para cuantificar el impacto de las variables seleccionadas y estimar la precisión, incluida la sensibilidad y la especificidad de la regla de clasificación.

Los coeficientes de la función discriminante fueron elegidos para maximizar la diferencia en la puntuación de la función discriminante para los dos grupos (es decir, una puntuación discriminante positiva indica un paciente que responde mientras una puntuación negativa indica un paciente que no responde). La interpretación de un valor "alto" o "bajo" para una bacteria en la función discriminante lineal es una medida relativa entre los grupos. Un valor alto para una bacteria contribuirá a clasificar al paciente como paciente que responde, mientras que un valor bajo hará lo contrario, cuando se organiza de manera que un paciente que responde da un valor de función positivo.

Resultados

Estudio 1 (IBS01-1302) - Pacientes con IBS y diarrea con dieta restringida en FODMAP

Análisis discriminante en la visita 1 para el subgrupo Diarrea (n=32, 16 + 16) en los grupos de quienes responden/quienes no responden para las 54 sondas de bacterias (se clasificaron como quienes responden aquellos con una reducción de al menos el 50 % en la puntuación total del IBS desde la línea base hasta la semana 4 de dieta restringida en FODMAP):

Las siguientes 6 sondas bacterianas fueron seleccionadas en un proceso de selección por pasos discriminante* entre las 54 candidatas:

- Bacteroides spp.
- Bacteroides stercosis
- Bacteroides zoogloformans
- Acinetobacter junii
- Firmicutes
- Veillonella spp., Helicobacter spp., and Clostridia

* Se aplicó una selección de variables por pasos utilizando un nivel de significancia de 0.10 como punto de corte para la inclusión y exclusión.

Los pacientes que responden tendieron a tener las siguientes características de línea base:

- Valores más bajos de Bacteroides spp.
- Valores más altos de Bacteroides stercosis
- Valores más altos de Bacteroides zoogloformans
- Valores más altos de Acinetobacter junii
- Valores más bajos de Firmicutes
- Valores más bajos de Veillonella spp., Helicobacter spp. y Clostridia

De 32 pacientes con IBS y Diarrea, 31 (97 %) fueron clasificados correctamente según lo anterior: 16/16 pacientes que responden (100 %) y 31/32 pacientes que no responden (94 %)

Estudio 1 (IBS01-1302) - Pacientes con IBS y estreñimiento con dieta restringida en FODMAP

Análisis discriminante en la Visita 1 para el subgrupo Estreñimiento (n=10, 5 + 5) en los grupos que responden/no responden para las 54 sondas bacterianas (se clasifican como pacientes que responden aquellos con una reducción de al menos el 50 % en la puntuación total del IBS desde el inicio hasta la semana 4 de dieta restringida en FODMAP):

Las siguientes 4 sondas bacterianas fueron seleccionadas en un proceso de selección por pasos discriminante* entre las 54 candidatas:

- Eubacterium siraeum
- Acinetobacter junii
- Clostridium methylpentosum
- Desulfitopora alkaliphila

* Se aplicó una selección de variables por pasos utilizando un nivel de significancia de 0.10 como punto de corte para la inclusión y exclusión.

Los pacientes que responden tendieron a tener las siguientes características de línea base:

- Valores más altos de Eubacterium siraeum
- Valores más bajos de Acinetobacter junii
- Valores más altos de Clostridium methylpentosum
- Valores más bajos de Desulfitopora alkaliphila

De 10 pacientes con INS-Estreñimiento, los 10 (100 %) fueron clasificados correctamente según lo anterior.

Estudio 2 (COP1602) - Pacientes con IBS y diarrea con dieta restringida FODMAP

Análisis discriminante utilizando bacterias de línea base para el subgrupo IBS y Diarrea en los grupos de quienes responden/quienes no responden (n=11, 7/4) para las 54 sondas de bacterias.

(Se clasificaron como pacientes que responden aquellos con una reducción de al menos el 50 % en la puntuación total del IBS desde la línea base hasta la semana 3 de la dieta restringida FODMAP):

Las siguientes 3 sondas bacterianas fueron seleccionadas en un proceso de selección directa discriminante* entre las 54 candidatas:

- Dorea spp.
- Eubacterium siraeum
- Shigella spp. y Escherichia spp.

* Se aplicó una selección de variables directas utilizando un nivel de significancia de 0.10 como punto de corte para la inclusión.

Los pacientes que responden tendieron a tener las siguientes características de línea base:

- Valores más altos de Dorea spp.
- Valores más altos de Eubacterium siraeum
- Valores más bajos de Shigella spp. y Escherichia spp.

De 11 pacientes con IBS y Diarrea, 10 (90,9 %) fueron clasificados correctamente según lo anterior: 6/7 pacientes que responden (85,7 %) y 4/7 pacientes que no responden (100 %)

Estudio 2 (COP1602) - Pacientes con IBS y diarrea con una dieta alta en FOS

Análisis discriminante para los grupos que responden/no responden a una dieta alta en FOS para las 54 sondas bacterianas (se clasifican como pacientes que responden aquellos con una reducción de al menos el 50 % en la puntuación total del IBS desde la línea base hasta la semana 6 de la dieta FOS)

Las siguientes 3 sondas bacterianas fueron seleccionadas en un proceso de selección por pasos discriminante* entre las 54 candidatas:

- Eubacterium siraeum
- Firmicutes
- Bacteroides spp. y Prevotella spp.

* Se aplicó una selección de variables por pasos utilizando un nivel de significancia de 0.10 como punto de corte para la inclusión y exclusión.

5 Los pacientes que responden tendieron a tener las siguientes características de línea base:

- Valores más altos de Eubacterium siraeum
- Valores más altos de Firmicutes
- Valores más altos de Bacteroides spp. y Prevotella spp.

10 De 11 pacientes con IBS y Diarrea, los 11 (100 %) fueron clasificados correctamente según lo anterior.

Estudio 3 (COP1609) - Pacientes con IBS y Diarrea tratados con trasplante de microbiota fecal

15 Análisis discriminante utilizando bacterias de referencia para el subgrupo de IBS y Diarrea en los grupos de quienes responden/quienes no responden (n=8, 4/4) para las 54 sondas de bacterias (se clasificaron como pacientes que responden aquellos con una reducción de al menos 100 en la puntuación total de IBS desde la línea base hasta la semana 3 después del trasplante fecal) (3 pacientes utilizaron W1 como línea base):

20 Las siguientes 3 sondas bacterianas fueron seleccionadas en un proceso de selección directa discriminante* entre las 54 candidatas:

- Clostridium sp.
- Eubacterium hallii
- 25 • Bacteroides/Prevotella

* Se aplicó una selección de variables directa utilizando un nivel de significancia de 0,10 como punto de corte para la inclusión.

30 Los pacientes que responden tendieron a tener las siguientes características de línea base:

- Valores más altos de Clostridium sp.
- Valores más altos de Eubacterium hallii
- Valores más bajos de Bacteroides / Prevotella

35 Los 8 pacientes con IBS y diarrea fueron clasificados correctamente según lo anterior

Estudio 3 (COP1609) - Pacientes con IBS y Diarrea e IBS Mixto tratados con trasplante de microbiota fecal

40 Análisis discriminante utilizando bacterias de línea base para el subgrupo Diarrea/Mixto en los grupos de quienes responden/quienes no responden (n=13, 5/8) para las 54 sondas de bacterias (se clasificaron como pacientes que responden aquellos una reducción de al menos 100 en la puntuación total del IBS desde la línea base hasta semana 3 después del trasplante fecal) (3 pacientes utilizaron W1 como línea base):

45 Los pacientes que responden tendieron a tener las siguientes características de línea base:

- Valores más altos de Clostridium sp.
- Valores más bajos de Dialister invisus
- Valores más bajos de Bacteroides / Prevotella

50 Los 13 pacientes con diarrea/mixto fueron clasificados correctamente según lo anterior.

Ejemplo 2: Exploración de la composición de la microbiota intestinal como indicador de la respuesta clínica a la restricción dietética de FODMAP en pacientes con síndrome del intestino irritable

55 Materiales y métodos

Pacientes

60 Los pacientes con IBS fueron reclutados consecutivamente en una clínica ambulatoria de atención secundaria (Hospital Diaconal Lovisenberg, Oslo, Noruega) entre abril de 2013 y octubre de 2014. En resumen, todos los pacientes cumplían los criterios de Roma III para el IBS y fueron examinados minuciosamente por el mismo gastroenterólogo experimentado para excluir enfermedades orgánicas. Es de destacar que todos los pacientes se sometieron a una Prueba de aliento con ¹³C-D-xilosa para excluir mala absorción en el intestino delgado, y solo se incluyeron pacientes con niveles altos de excreción de ¹³CO₂ a continuación de la ingestión de ¹³C-D-xilosa.

Restricción dietética de FODMAP

Todos los pacientes fueron remitidos a asesoría nutricional por parte de un nutricionista experimentado, formado en el concepto de bajo FODMAP. Las dietas de línea base fueron evaluadas cuidadosamente para garantizar que ninguno de los pacientes tuviera una dieta particularmente restringida en comparación con la dieta noruega promedio antes de ingresar al estudio. Es de destacar que la dieta baja en FODMAP no era muy conocida en Noruega en el momento de su inclusión. Después se instruyó a los pacientes para que eliminaran estrictamente todos los alimentos que contengan cantidades excesivas de FODMAP, de acuerdo con los principios dados por la Universidad de Monash (Melborne, Australia). Por lo tanto, se instruyó a los pacientes para evitar alimentos que contengan galactooligosacáridos (por ejemplo, judías, lentejas, guisantes, etc.), fructanos (por ejemplo, trigo, repollo, cebolla, etc.), lactosa (por ejemplo, leche, yogur, productos lácteos, etc.) y polioles (por ejemplo, champiñones, coliflor, albaricoques, etc., incluidos los alimentos endulzados con polioles), así como alimentos que contienen fructosa en exceso de glucosa (por ejemplo, manzanas, peras, frutos secos, etc.). Se sugirieron alimentos con bajo contenido de FODMAP, como naranjas, bananos, arroz, avena, carne, pescado, huevos y productos lácteos sin lactosa, como alternativas a los alimentos con alto contenido de FODMAP. La duración de la intervención dietética fue de 4 semanas. A lo largo del estudio, se garantizó el cumplimiento de la dieta mediante un seguimiento estrecho por parte del nutricionista, incluidas consultas personales, teléfono y correspondencia por correo electrónico, y dieta se evaluó el cumplimiento de la mediante la evaluación de los diarios de alimentos que se pidió a los pacientes que completaran.

Evaluación de síntomas y definición de respuesta a la dieta.

Se evaluó la gravedad de los síntomas abdominales antes y después de la intervención dietética, mediante el sistema de puntuación de la gravedad del intestino irritable (IBS-SSS), de acuerdo con Francis et al. (supra). La puntuación máxima alcanzable de este inventario es 500 puntos, lo que permite clasificar la gravedad de los síntomas de la siguiente manera: leve (75-175 puntos), moderada (175-300 puntos) y grave (>300 puntos). Según lo recomendado por el Comité de Diseño de Ensayos de Tratamiento de Roma, se definió que los pacientes que responden a la intervención dietética son aquellos pacientes que informaron una disminución $\geq$ 50 % en el IBS-SSS. De acuerdo con ello, se definió que los pacientes que no responden son aquellos pacientes que informaron una disminución <50 % en el IBS-SSS.

Además de la evaluación de los síntomas abdominales, se evaluó la gravedad de los síntomas extraintestinales en la línea base, utilizando la Escala Hospitalaria de Ansiedad y Depresión (HADS) para evaluar la ansiedad y la depresión, y la Escala de Impacto de la Fatiga (FIS) para evaluar la fatiga crónica.

Análisis de la composición de la microbiota intestinal

Los pacientes recogieron muestras fecales antes y después de la intervención dietética utilizando contenedores designados (Genetic Analysis, Oslo, Noruega). Se les indicó cuidadosamente que congelaran las muestras inmediatamente a -20 °C en casa y que llevaran los contenedores congelados al hospital tan pronto como fuera posible. Posteriormente, se almacenaron las muestras a -80 °C y no se descongelaron hasta el análisis. Para evaluar la composición microbiana intestinal, se utilizó la Prueba de disbiosis GAmap^{MR} (supra). Los resultados fueron proporcionados como abundancia relativa de bacterias de acuerdo con los 54 marcadores bacterianos objetivo, medidos como "intensidad de la señal de fluorescencia", y como un índice de disbiosis (DI; intervalo 0-5), donde DI >2 es indicado como "disbiótico".

Métodos estadísticos

Debido a un tamaño de muestra limitado, todas las variables continuas fueron comparadas entre los que respondieron y los que no respondieron, mediante el uso de pruebas no paramétricas; prueba de Mann-Whitney Wilcoxon cuando se compararon variables no relacionadas, y prueba de intervalos con signo de Wilcoxon cuando se compararon mediciones antes y después del tratamiento. Las posibles asociaciones entre pares de variables categóricas fueron evaluadas mediante la prueba de Chi cuadrado o la prueba de McNemar al comparar proporciones antes y después del tratamiento. La correlación fue calculada utilizando la rho de Spearman. Para explorar la capacidad de discriminación de todos los marcadores bacterianos medidos para distinguir entre los que responden y los que no responden, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) utilizando una matriz de covarianza. La probabilidad de ser un paciente que responde fue calculada mediante regresión logística y los resultados fueron expresados como proporciones impares (OR) con intervalos de confianza (IC) del 95 %. Además, se calcularon las probabilidades dadas las covariables seleccionadas. El valor predictivo positivo (PPV) fue calculado como lo describe Altman (Altman DG, et al, Statistics with confidence. 2ª ed. Nueva York: BMJ Books; 2000). Debido a un tamaño de muestra limitado, no se pudo dividir nuestros datos en un conjunto de entrenamiento y un conjunto de prueba, por lo que la evaluación del modelo fue realizada mediante validación cruzada (CV) de 5 veces (James G, et al, An introduction to statistical learning. Nueva York: Springer; 2013). Se calculó la precisión como una puntuación media de CV con un IC del 95 %. Dado que nuestros análisis se consideraron exploratorios, no se realizó

ninguna corrección para pruebas múltiples y los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Todos los análisis fueron realizados utilizando SPSS versión 22 y R (lenguaje de programación), versión 3.3.2.

5 Resultados

Características de los sujetos: quienes responden y quienes no responden

10 Inicialmente se inscribieron 63 pacientes; sin embargo, se perdieron muestras fecales de 2 pacientes para el análisis de la composición de la microbiota intestinal, lo que redujo el número total de participantes a 61. Según la definición de paciente que responde (disminución ≥ 50 % en IBS-SSS (13)), se clasificaron 32 pacientes como quienes responden y 29 pacientes como quienes no responden a la intervención dietética. Los que responden y los que no responden no difirieron significativamente con respecto a las características clínicas de línea base (Tabla 1).

15

Tabla 1 - Comparación de las características de línea base de pacientes con IBS clasificados como quienes responden ($n = 32$) y quienes no responden ($n = 29$) a una dieta restringida en FODMAP de 4 semanas.

Variable	Quienes responden ($n = 32$)	Quienes no responden ($n = 29$)	Valor p
Mujeres, n (%)	29 (91)	25 (86)	0,70
Edad, años, mediana (intervalo)	32.5 (19-67)	39 (25-66)	0.05
IMC, kg/m^2 , mediana (intervalo)	25.3 (17.7-35.8)	23.4 (18.2-30.2)	0.18
Subtipo de IBS, n (%)			0.93
- IBS-D	16 (50)	16 (55)	
- IBS-C	5 (16)	5 (17)	
- IBS-M	11 (34)	8 (28)	
IBS-SSS, mediana (intervalo)			
- Puntuación total IBS-SSS	294 (174-449)	281 (105-459)	0,15
- Puntuación de dolor	107 (0-173)	87 (0-196)	0,07
- Puntuación de hinchazón	64 (25-100)	52 (0-97)	0,19
- Puntuación del hábito intestinal	72,5 (34-100)	69 (34-100)	0,49
- Puntuación de interferencia de vida	69 (44-99)	69 (35-99)	0,42
Gravedad del IBS, n (%)			0,87
- Leve	0(0)	0(0)	
- Moderada	17 (53)	16 (55)	
- Severa	15(47)	13 (45)	
HADS, mediana (intervalo)			
- Puntuación total HADS	14,5 (5-31)	13 (0-31)	0,55
- Puntuación de ansiedad	10 (2-18)	8 (0-18)	0,68
- Puntuación de depresión	4,5 (0-13)	3 (0-13)	0,23
FIS, mediana (intervalo)	69,5 (12-155)	75 (1-147)	0,57
IMC = índice de masa corporal; IBS = síndrome del intestino irritable; IBS-D = IBS con predominio de diarrea; IBS-C = IBS con predominio de estreñimiento; IBS-M = IBS con hábitos intestinales mixtos; IBS-SSS = sistema de puntuación de la gravedad del síndrome del intestino irritable; HADS = Escala Hospitalaria de Ansiedad y Depresión; FIS = Escala de Impacto por Fatiga.			

20 La distribución por género fue similar en ambos grupos, siendo una gran mayoría mujeres. El índice de masa corporal (IMC) y la distribución de los subtipos de IBS también fueron similares; sin embargo, los pacientes que responden tendieron a ser ligeramente más jóvenes que los que no responden.

No hubo diferencias entre los que respondieron y los que no respondieron respecto a ninguna de las mediciones del IBS-SSS. La distribución de las categorías del IBS-SSS también fue muy similar en ambos grupos, y ninguno de los pacientes fue clasificado como teniendo IBS-SSS leve antes del tratamiento. Sin embargo, después del tratamiento, 13 de los 32 que respondieron informaron IBS-SSS leve, mientras que sólo uno de los que no respondieron estaba en esta categoría después del tratamiento. Después del tratamiento, ambos grupos informaron puntuaciones estadísticamente significativas más bajas de IBS-SSS en comparación con la línea base (ambos $p < 0,01$).

Perfil de microbiota intestinal

Se compararon los perfiles bacterianos de los que respondieron y los que no respondieron basándose en datos de 54 marcadores bacterianos. La capacidad general de todos los marcadores bacterianos medidos para distinguir entre quienes responden y quienes no responden fue evaluada mediante el método PCA. La solución de tres factores se muestra en la Figura 21. Los que respondieron tenían niveles significativamente más altos para los siguientes marcadores bacterianos (Tabla 2): *Bacteroides fragilis*, *Acinetobacter junii*, *Ruminiclostridium*, *Streptococcus* y *Eubacterium* (todos $p < 0.05$). Además, los que respondieron tenían niveles significativamente más bajos para los siguientes marcadores bacterianos (Tabla 2): *Clostridia/Negativicutes/Bacilli* (Firmicutes), *Actinomycetales*, *Anaerotruncus*, *Clostridiales* y *Shigella spp.* y *Escherichia spp.* (todos $p < 0.05$).

Tabla 2 - Abundancia bacteriana en muestras fecales de línea base recolectadas de quienes responden y quienes no responden a una dieta baja en FODMAP. Los resultados son listados como señal de intensidad mediana con 25-75 percentiles de los marcadores de ADN bacteriano.

Objetivo microbiano	Quienes responden (n=31)	Quienes no responden (n = 29)	valor p*
<i>Bacteroides fragilis</i> [s]	27.4 (11.1-58.6)	8.0 (5.2-45.7)	0.04
<i>Acinetobacter junii</i>	188.9 (178.9-195.7)	177.4 (172.5-189.1)	0.02
<i>Ruminiclostridium</i> [g]	51.3 (46.2-63.2)	45.7 (42.9-50.7)	0.01
<i>Clostridia</i> [cl], <i>Negativicutes</i> [cl], <i>Bacilli</i> [cl] (Firmicutes)	486.3 (385.6-597.0)	622.5 (450.3-694.4)	0.02
<i>Streptococcus</i> III [g]	13.8 (7.9-51.9)	8.5 (5.8-11.9)	0.03
<i>Actinomycetales</i> [o]	5.8 (1.2-9.6)	10.0 (4.2-20.9)	0.02
<i>Anaerotruncus</i> [g]	75.6 (63.7-90.4)	83.7 (77.9-90.4)	<0.01
<i>Clostridiales</i> [o]	275.4 (248.4-300.0)	285.5 (275.3-298.2)	<0.01
<i>Eubacterium</i> II [g]	32.5 (11.9-61.0)	19.4 (10.7-61.4)	0.03
<i>Shigella spp.</i> [g], <i>Escherichia spp.</i> [gramo]	12.2 (8.2-21.6)	15.3 (10.7-22.9)	0.04
s = especie; g = género; o = orden; cl = clase			
*Prueba de Mann-Whitney Wilcoxon			

Para los 44 marcadores bacterianos restantes, los datos no revelaron ninguna diferencia entre los que respondieron y los que no respondieron. Las diferencias entre los que respondieron y los que no respondieron continuaron siendo estadísticamente significativas también después del tratamiento para 8 de los 10 marcadores bacterianos descritos anteriormente. Los dos marcadores bacterianos que no fueron estadísticamente significativos después de la dieta se focalizaron a *Bacteroides fragilis* y *Acinetobacter junii*, ya que los niveles de estos disminuyeron algo después del tratamiento en el grupo que respondió (mediana de 27.4 a 24.2, $p = 0.16$ y mediana de 188.9 a 183.6, $p = 0.19$, para *Bacteroides fragilis* y *Acinetobacter junii*, respectivamente).

Aproximadamente la mitad de los individuos evaluados fueron clasificados como "disbióticos" (DI > 2) antes del tratamiento, siendo las proporciones de quienes responden y quienes no responden similares, 50 % (16/32) y 48 % (14/29), respectivamente. Estas proporciones aumentaron numéricamente, pero no de manera estadísticamente significativa, después del tratamiento, y permanecieron muy similares para los que respondieron y los que no respondieron; 56 % (18/32) y 59 % (17/29), respectivamente. Sin embargo, muchos pacientes, tanto entre los que respondieron como entre los que no respondieron, cambiaron su clasificación DI después del tratamiento. Para los que no respondieron, 7 se convirtieron en "disbióticos" y 5 en "no disbióticos". El número de estos pacientes fue ligeramente menor en el grupo que respondió, en el cual 5 se tornaron "disbióticos" y 3 tuvieron un valor normal de DI después del tratamiento. Cuando se midieron en una escala de

1 a 5, las puntuaciones DI se mantuvieron sin cambios tanto para los que respondieron como para los que no respondieron después del tratamiento. La mediana (intervalo) fue de 3 (1-4) para los que respondieron y de 3 (1-5) para los que no respondieron, tanto antes como después del tratamiento.

5 Índice de respuesta (RI)

De los 54 marcadores bacterianos utilizados para evaluar la composición microbiana intestinal antes del tratamiento, 10 fueron significativamente diferentes entre los que respondieron y los que no respondieron (como se describió anteriormente). Con base en los valores de mediana de los que respondieron para estos marcadores, se construyó un índice de respuesta (RI) de la siguiente manera:

1. Los valores de mediana de quienes respondieron para los 10 marcadores bacterianos seleccionados fueron utilizados como niveles de corte.
2. A cada paciente se le asignó un punto cuando su valor para cada marcador seleccionado difería del valor de corte. Por cada marcador que era menos abundante en quienes respondieron que en los quienes no respondieron, se le daba al paciente un punto cuando el nivel de dicho marcador en su muestra era inferior al nivel de corte. Por cada marcador que era más abundante en quienes respondieron que en los quienes no respondieron, se le daba al paciente un punto cuando el nivel de dicho marcador era superior al nivel de corte.
3. Los puntos se sumaron, dando un número del 0 al 10 (puntuación suma RI). Esta suma fue separada aún más: a los pacientes que obtuvieron 3 puntos o menos se les asignó el valor 0 (respuesta negativa) y a los pacientes que obtuvieron 4 o más puntos se les asignó el valor 1 (respuesta positiva).
4. Finalmente, se validó el desempeño de RI y se calculó la precisión como la puntuación media: 0,72, IC 95 % [0.63; 0.81].

Aunque hubo una gran diversidad en nuestros resultados antes del tratamiento, los que respondieron alcanzaron sumas de puntuaciones de RI más altas en comparación con los que no respondieron (mediana de 4.9 para los que respondieron y 2.6 para los que no respondieron, intervalo de 0 a 9 para ambos). Además, hubo una correlación estadísticamente significativa entre la puntuación total de RI y la disminución porcentual en IBS-SSS ($\rho = 0.39$, $p < 0.001$; Figura 22). La mayoría de los que respondieron alcanzaron puntuaciones altas de suma RI también después de su tratamiento.

RI antes del tratamiento

En total, el 60 % (19/32) de los que respondieron obtuvieron 4 puntos o más en la puntuación suma del RI, mientras que sólo el 21 % (6/29) de los que no respondieron tuvieron un RI positivo. Los que respondieron eran más jóvenes y tenían un IMC ligeramente más alto, por lo que los análisis adicionales se ajustaron para estos posibles factores de confusión. Cuando se ajustó por edad e IMC, solo el ser paciente que responde permaneció fuertemente asociado estadísticamente con RI positivo ($p < 0.004$). Sin embargo, la edad se mantuvo en el modelo final. Los pacientes con un RI positivo tenían 5 veces más probabilidades de responder en comparación con aquellos que obtuvieron una puntuación más baja ($OR = 5.05$, IC del 95 % [1.58; 16.10]). Los pacientes más jóvenes tenían más probabilidades de responder ($p = 0.04$). La probabilidad de responder para los pacientes que tenían un RI positivo fue del 83,4 %, IC del 95 % [61.2 - 94 %]. Además, se calculó la probabilidad de que un paciente responda a la dieta FODMAP dado un RI positivo, es decir, el valor predictivo positivo: PPV = 76.0, IC 95 % [61.1-86.9].

RI después del tratamiento

La mayoría de los que respondieron tuvieron un RI positivo también después del tratamiento. En total, el 56 % (18/32) de los que respondieron obtuvieron puntuaciones positivas en comparación con el 14 % (4/29) de los que no respondieron. Cuando se ajustaron por edad e IMC, los que respondieron tuvieron más de 7 veces más probabilidades de obtener una puntuación positiva utilizando el RI, en comparación con los que no respondieron ($OR = 7.31$, IC del 95 % [1.90-28.23], $p = 0.004$).

Discusión

Durante la última década, ha surgido cada vez más evidencia de que la microbiota intestinal desempeña un papel importante en la patogénesis del IBS. Mientras que la microbiota asociada a la mucosa parece influir principalmente en el huésped a través del sistema de control regulatorio ubicado dentro de la pared intestinal, la microbiota luminal parece ejercer efectos principalmente a través de la fermentación, produciendo gas y otros metabolitos. Ambos compartimentos parecen estar alterados en pacientes con IBS y dichas alteraciones pueden estar implicadas en la generación de síntomas. En el presente estudio, se evaluó la composición de la microbiota fecal mediante la evaluación de marcadores de ADN bacteriano.

Los datos actuales sugieren que los niveles previos al tratamiento de marcadores de ADN microbianos intestinales seleccionados, pueden estar asociados con una mayor probabilidad de responder favorablemente a la restricción de FODMAP en la dieta. Aunque a partir del presente estudio no se puede determinar una

- 5 relación mecanística entre la composición de la microbiota intestinal y la generación de síntomas del IBS, los resultados sugieren que dichos marcadores de ADN microbiano pueden ser usados antes del tratamiento como indicadores de la probable respuesta al tratamiento y, por lo tanto, pueden tener un valor significativo en un ajuste clínico. La incorporación de información de dichos marcadores a un sistema de puntuación, por ejemplo el RI descrito en el presente documento, puede permitir la aplicación sencilla, uniforme y repetible de esta evaluación en ajustes clínicos.

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para determinar la probabilidad de que un sujeto con síndrome del intestino irritable (IBS) responda al tratamiento con una dieta de intervención para el IBS, en donde dicha dieta de intervención para el IBS es una dieta baja en FODMAP, comprendiendo dicho método

(i) determinar para una muestra de prueba del tracto gastrointestinal de un sujeto con IBS de subtipo de diarrea o IBS de subtipo mixto que va a ser tratado con una dieta baja en FODMAP, la cantidad de bacterias de al menos un grupo taxonómico seleccionado de

- Acinetobacter junii
- Bacteroides stercosis
- Bacteroides zoogloformans
- Dorea spp.
- Eubacterium siraeum
- Clostridium sp.
- Eubacterium hallii
- Bacteroides spp.
- Firmicutes
- Veillonella spp., Helicobacter spp. y Clostridia; y
- Shigella spp. y Escherichia spp. y

(ii)(a) comparar la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico con un valor de referencia preparado a partir de al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto no sintomático para IBS y determinar si la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico en dicha muestra de prueba difiere del valor de referencia o corresponde a él, en donde una cantidad de bacterias en los grupos taxonómicos Acinetobacter junii, Bacteroides stercosis, Bacteroides zoogloformans, Dorea spp., Eubacterium siraeum, Clostridium sp., o Eubacterium hallii, que es superior a los valores de referencia, o una cantidad de bacterias de los grupos taxonómicos Bacteroides spp., Firmicutes, Veillonella spp., Helicobacter spp. y Clostridia, o Shigella spp. y Escherichia spp. que es inferior a los valores de referencia, es indicativo de que el sujeto responderá a una dieta baja en FODMAP; y/o

(ii)(b) comparar la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico con un valor de corte que ha sido determinado como una cantidad mediana de dichas bacterias en al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto con IBS con dicho subtipo de IBS, del que previamente se ha demostrado que responde a dicho tratamiento, y determinar si la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico en dicha muestra de prueba es mayor o menor que dicho valor de corte de mediana, en donde una cantidad de bacterias en los grupos taxonómicos Acinetobacter junii, Bacteroides stercosis, Bacteroides zoogloformans, Dorea spp., Eubacterium siraeum, Clostridium sp. o Eubacterium hallii que es mayor que dicho valor de corte de mediana para dichas bacterias, o una cantidad de bacterias en los grupos taxonómicos Bacteroides spp., Firmicutes, Veillonella spp., Helicobacter spp. y Clostridia, o Shigella spp. y Escherichia spp., que es menor que dicho valor de corte de mediana para dichas bacterias, es indicativo de que el sujeto responderá a una dieta baja en FODMAP.

2. Un método in vitro para determinar la probabilidad de que un sujeto con síndrome del intestino irritable (IBS) responda al tratamiento con una dieta de intervención para el IBS, en donde dicha dieta de intervención para el IBS es una dieta alta en FOS, comprendiendo dicho método

(i) determinar para una muestra de prueba del tracto gastrointestinal de un sujeto con IBS de subtipo de diarrea o IBS de subtipo mixto que va a ser tratado con una dieta alta en FOS, la cantidad de bacterias de al menos un grupo taxonómico seleccionado de

- Eubacterium siraeum
- Firmicutes, y
- Bacteroides spp. y Prevotella spp.; y

(ii)(a) comparar la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico con un valor de referencia preparado a partir de al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto no sintomático para IBS, y determinar si la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico en dicha muestra de prueba difiere del valor de referencia o corresponde a él, en donde una cantidad de bacterias en los grupos taxonómicos Eubacterium siraeum, Firmicutes o Bacteroides spp. y Prevotella spp. que es mayor que los valores de referencia, es indicativa de que el sujeto responderá a una dieta alta en FOS; y/o

(ii)(b) comparar la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico con un valor de corte que ha sido determinado como una cantidad mediana de dichas bacterias en al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto con IBS con dicho subtipo de IBS, del que previamente se ha demostrado que responde a dicho tratamiento, y determinar si la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo

taxonómico en dicha muestra de prueba es mayor que o menor que dicho valor de corte de mediana, en donde una cantidad de bacterias en los grupos taxonómicos *Eubacterium siraeum*, *Firmicutes* o *Bacteroides* spp. y *Prevotella* spp. que es mayor que dicho valor de corte de mediana para dichas bacterias, es indicativo de que el sujeto responderá a una dieta alta en FOS.

5

3. Un método in vitro para determinar la probabilidad de que un sujeto con síndrome del intestino irritable (IBS) responda al tratamiento con una dieta de intervención para el IBS, en donde dicha dieta de intervención para el IBS es una dieta baja en FODMAP, comprendiendo dicho método

10 (i) determinar para una muestra de prueba del tracto gastrointestinal de un sujeto con IBS de subtipo de estreñimiento que va a ser tratado con una dieta baja en FODMAP, la cantidad de bacterias de al menos un grupo taxonómico seleccionado de

- *Clostridium methylpentosum*
 15 - *Eubacterium siraeum*
 - *Acinetobacter junii*, y
 - *Desulfitipora alkaliphila*; y

20 (ii)(a) comparar la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico con un valor de referencia preparado a partir de al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto no sintomático para IBS, y determinar si la cantidad de dicha bacteria bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico en dicha muestra de prueba difiere del valor de referencia o corresponde a él, en donde una cantidad de bacterias en los grupos taxonómicos *Clostridium methylpentosum* o *Eubacterium siraeum* que es mayor que los valores de referencia, o una cantidad de bacterias en los grupos taxonómicos *Acinetobacter junii* o *Desulfitipora alkaliphila* que es inferior a los valores de referencia, es indicativa de que el sujeto responderá a una dieta baja en FODMAP; y/o

25 (ii)(b) comparar la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico con un valor de corte que ha sido determinado como una cantidad mediana de dichas bacterias en al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto con IBS con dicho subtipo de IBS, del que previamente se ha demostrado que responde a dicho tratamiento, y determinar si la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico en dicha muestra de prueba es mayor que o menor que dicho valor de corte de mediana, en donde una cantidad de bacterias en los grupos taxonómicos *Clostridium methylpentosum* o *Eubacterium siraeum* que es mayor que dicho valor de corte de mediana para dichas bacterias, o una cantidad de bacterias en los grupos taxonómicos *Acinetobacter junii* o *Desulfitipora alkaliphila* que es menor que dicho valor de corte de mediana para dichas bacterias, es indicativa de que el sujeto responderá a una dieta baja en FODMAP.

35 4. Un método in vitro para determinar la probabilidad de que un sujeto con síndrome del intestino irritable (IBS) responda al tratamiento con un trasplante de microbiota fecal (FMT), comprendiendo dicho método

40 (i) determinar para una muestra de prueba del tracto gastrointestinal de un sujeto con IBS de subtipo de diarrea que va a ser tratado con FMT, la cantidad de bacterias de al menos un grupo taxonómico seleccionado de

- *Clostridium* sp.
 - *Eubacterium hallii*, y
 45 - *Bacteroides* spp. y *Prevotella* spp.; y

(ii)(a) comparar la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico con un valor de referencia preparado a partir de al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto no sintomático para IBS, y determinar si la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico en dicha muestra de prueba difiere del valor de referencia o corresponde a él, en donde una cantidad de bacterias en el grupo taxonómico *Clostridium* sp., o *Eubacterium hallii* que es mayor que los valores de referencia, o una cantidad de bacterias del grupo taxonómico *Bacteroides* spp. y *Prevotella* spp., que es inferior a los valores de referencia es indicativo de que el sujeto responderá al FMT; y/o

50 (ii)(b) comparar la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico con un valor de corte que ha sido determinado como una cantidad mediana de dichas bacterias en al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto con IBS con dicho subtipo de IBS, del que previamente se ha demostrado que responde a dicho tratamiento y determinar si la cantidad de dicha bacteria de dicho al menos un grupo taxonómico en dicha muestra de prueba es mayor que o menor que dicho valor de corte de mediana, en donde una cantidad de bacterias en el grupo taxonómico *Clostridium* sp., o *Eubacterium hallii* que es mayor que dicho valor de corte de mediana para dichas bacterias, o una cantidad de bacterias en el grupo taxonómico *Bacteroides* spp. y *Prevotella* spp., que es menor que dicho valor de corte de mediana para dichas bacterias, es indicativa de que el sujeto responderá al FMT.

55 5. Un método in vitro para determinar la probabilidad de que un sujeto con síndrome del intestino irritable (IBS) responda al tratamiento con un trasplante de microbiota fecal (FMT), comprendiendo dicho método

65

(i) determinar para una muestra de prueba del tracto gastrointestinal de un sujeto con IBS de subtipo mixto que va a ser tratado con FMT, la cantidad de bacterias de al menos un grupo taxonómico seleccionado de

- *Clostridium* sp.
- *Bacteroides* spp. y *Prevotella* spp., y
- *Dialister invisus*; y

(ii)(a) comparar la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico con un valor de referencia preparado a partir de al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto no sintomático para IBS, y determinar si la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico en dicha muestra de prueba difiere de, o corresponde a, el valor de referencia, en donde una cantidad de bacterias en el grupo taxonómico *Clostridium* sp., que es mayor que los valores de referencia, o una cantidad de bacterias en los grupos taxonómicos *Bacteroides* spp. y *Prevotella* spp., y *Dialister invisus* que es inferior a los valores de referencia es indicativa de que el sujeto responderá al FMT; y/o

(ii)(b) comparar la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico con un valor de corte que ha sido determinado como una cantidad mediana de dichas bacterias en al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto con IBS con dicho subtipo de IBS, del que previamente se ha demostrado que responde a dicho tratamiento, y determinar si la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico en dicha muestra de prueba es mayor que o menor que dicho valor de corte de mediana, en donde un cantidad de bacterias en el grupo taxonómico *Clostridium* sp., que es mayor que dicho valor de corte de mediana para dichas bacterias, o una cantidad de bacterias en los grupos taxonómicos *Bacteroides* spp. y *Prevotella* spp., y *Dialister invisus* que es menor que dicho valor de corte de mediana para dichas bacterias, es indicativa de que el sujeto responderá al FMT.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde se determinan las cantidades de bacterias en al menos 2, 3, 4 o todos dichos grupos taxonómicos y en el paso (ii)(a) se realiza una comparación con valores de referencia para dichos grupos taxonómicos, preparados a partir de al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto no sintomático para IBS, y/o en el paso (ii)(b) se realiza la comparación con valores de corte para dichos grupos taxonómicos preparados a partir de al menos una muestra del tracto gastrointestinal de al menos un sujeto con IBS con dicho subtipo de IBS y del que previamente se ha demostrado que responde a dicho tratamiento.

7. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde el método comprende además determinar adicionalmente la cantidad de bacterias en al menos un grupo taxonómico seleccionado de *Acinetobacter junii*, *Firmicutes*, *Shigella* spp. y *Escherichia* spp., *Bacteroides fragilis*, *Ruminiclostridium*, *Streptococcus*, *Actinomycetales*, *Anaerotruncus*, *Clostridiales* y *Eubacterium*, comparando dicha cantidad con un valor de referencia para una muestra del tracto gastrointestinal de sujetos normobióticos y/o un valor de corte de mediana para una muestra del tracto gastrointestinal de sujetos con IBS de los que previamente se ha demostrado que responden al tratamiento con una dieta de intervención para IBS o FMT, y determinar si la cantidad de dichas bacterias de dicho al menos un grupo taxonómico en dicha muestra de prueba difiere de o corresponde al valor de referencia normobiótico y/o es mayor o menor que dicho valor de corte de mediana.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la cantidad de bacterias de al menos un grupo taxonómico es determinada mediante un método de análisis de ácidos nucleicos, preferiblemente determinación de secuencia de ácidos nucleicos, hibridación de sondas de oligonucleótidos, amplificación de ácidos nucleicos basada en cebadores; detección basada en anticuerpos u otro ligando de afinidad específica; análisis proteómico o análisis metabólico.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la muestra del tracto gastrointestinal es seleccionada de entre

- (a) contenido luminal del tracto gastrointestinal, preferiblemente contenido estomacal, contenido intestinal, moco y heces/excremento, o combinaciones de los mismos,
- (b) partes de la mucosa, la submucosa, la muscular externa, la adventicia y/o la serosa de un tejido/órgano del tracto gastrointestinal,
- (c) ácido nucleico preparado a partir de (a) o (b), preferiblemente mediante transcripción inversa y/o amplificación de ácido nucleico, o
- (d) un cultivo microbiano de (a) o (b).

Fig. 1

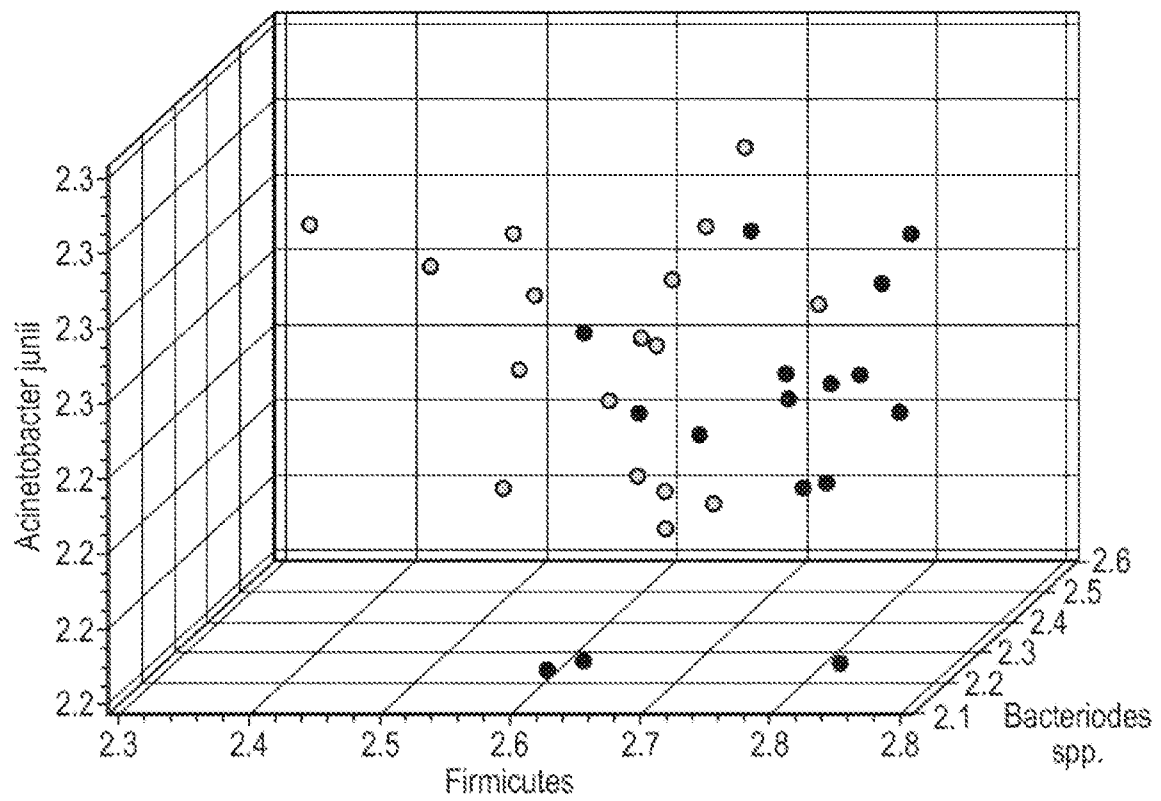


Fig. 2

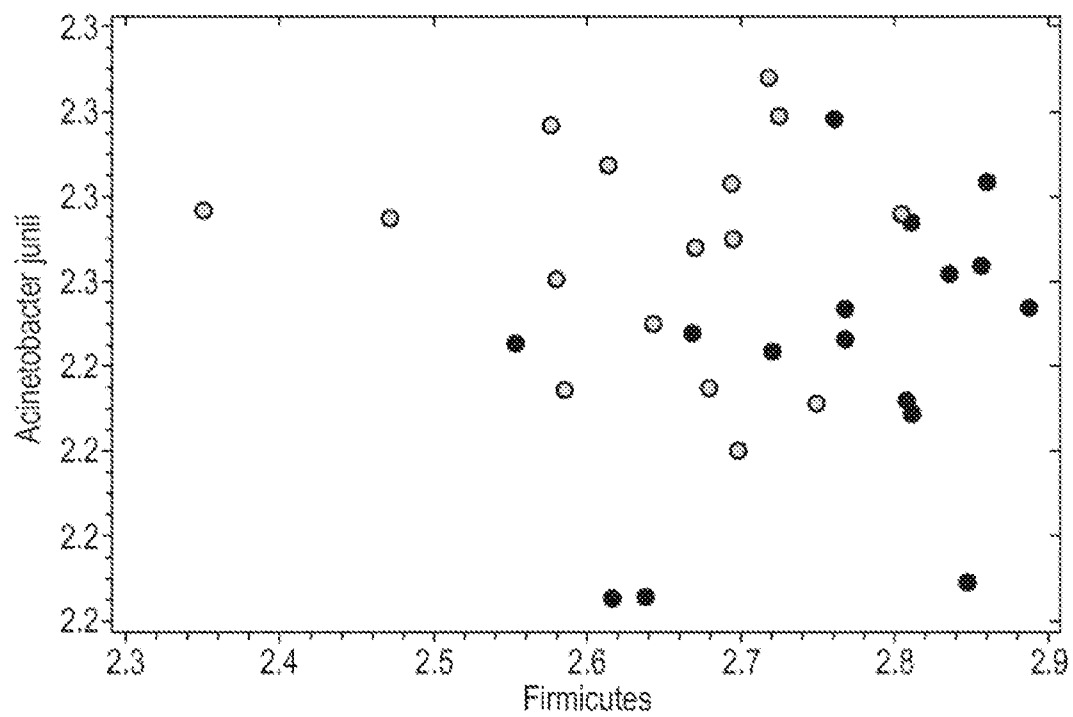


Fig. 3

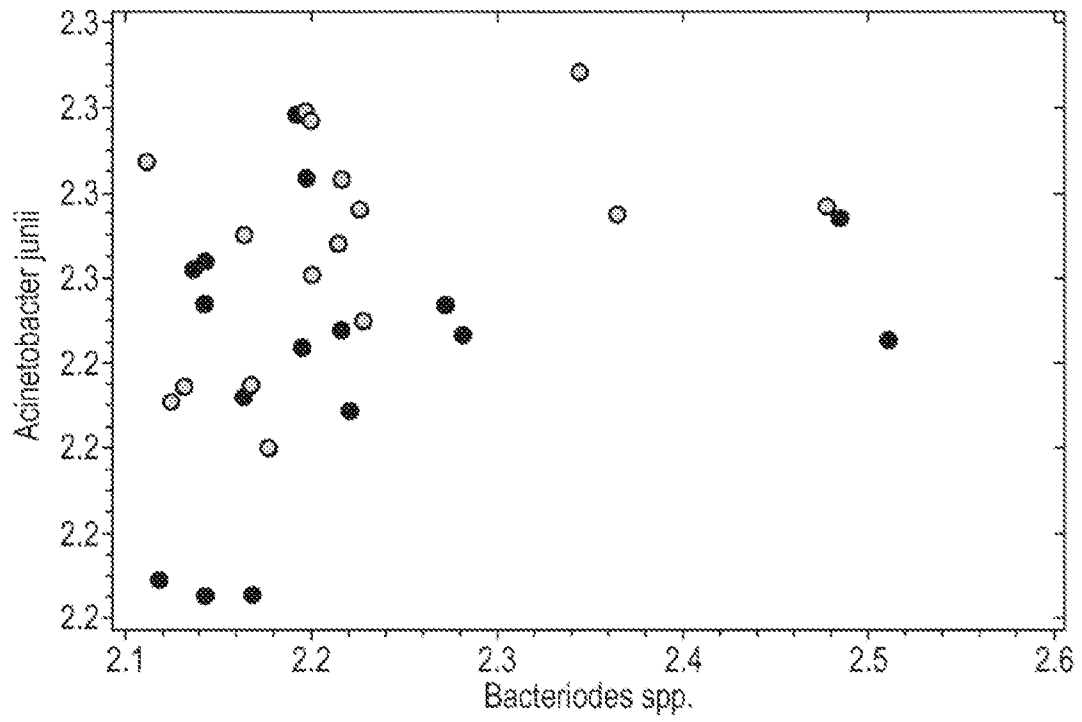


Fig. 4

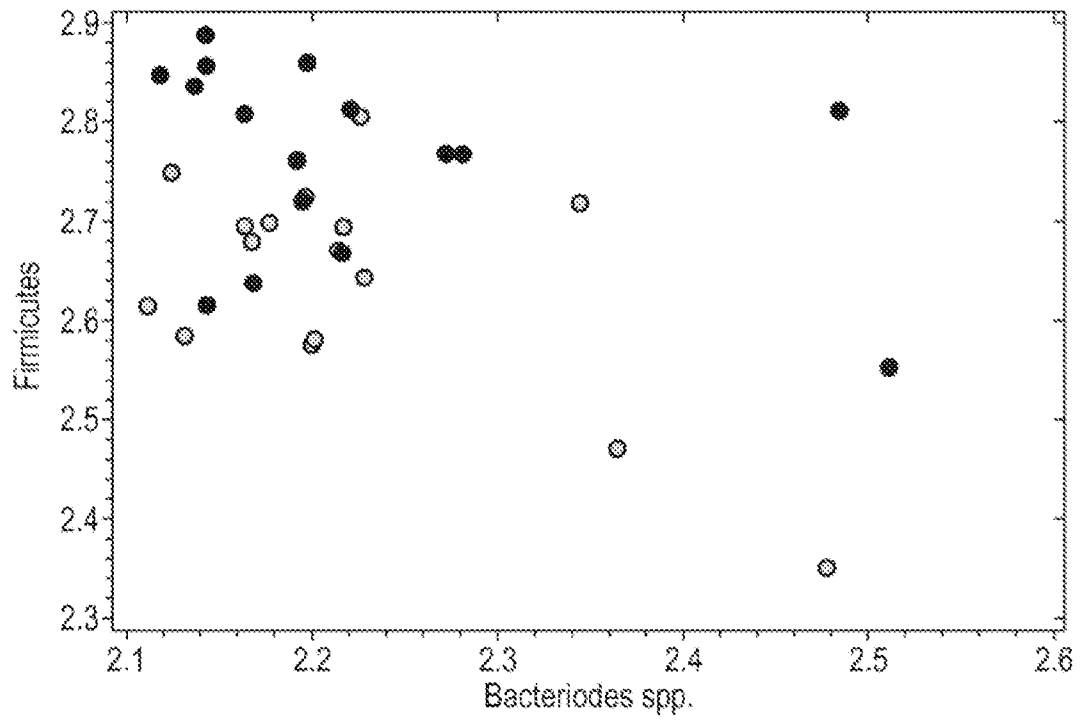


Fig. 5

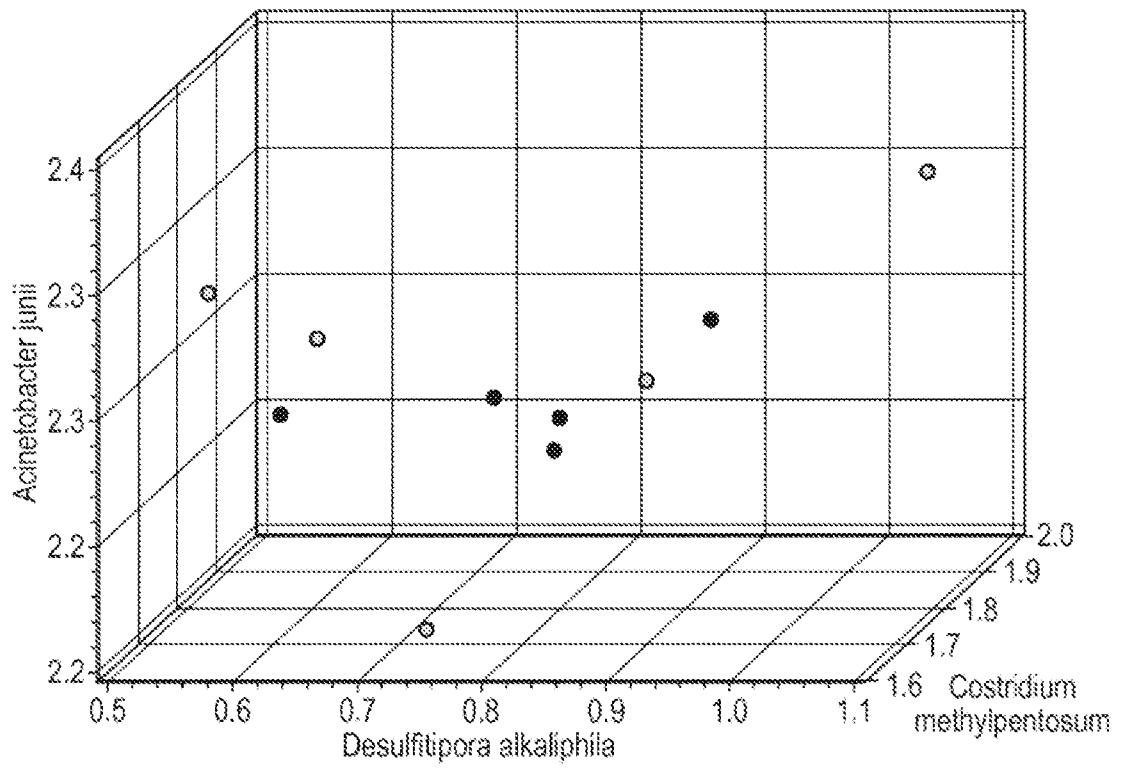


Fig. 6

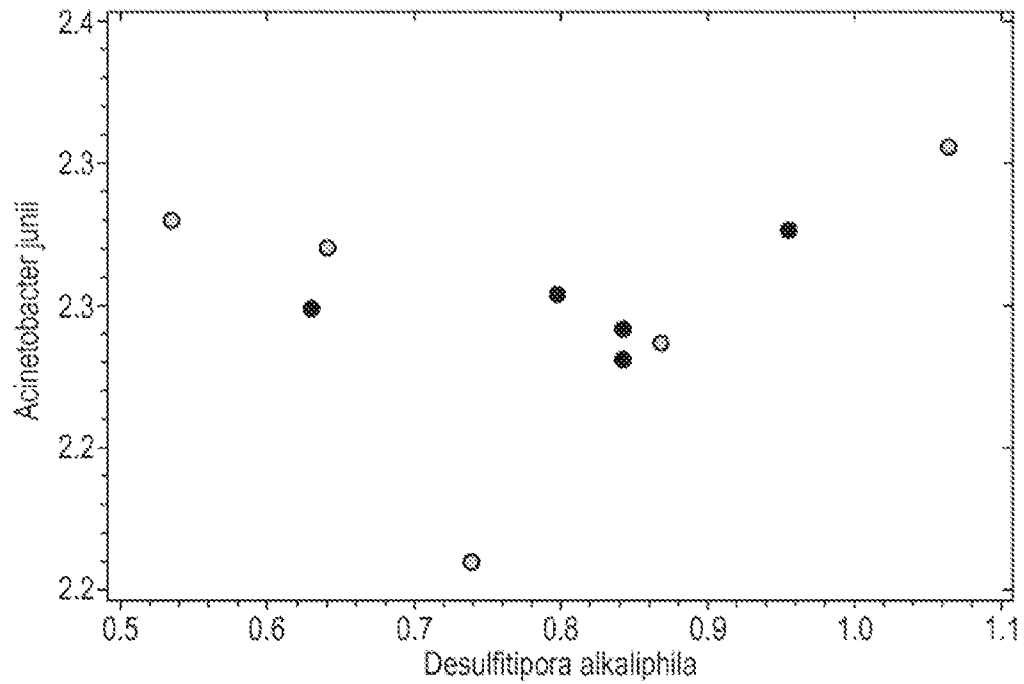


Fig. 7

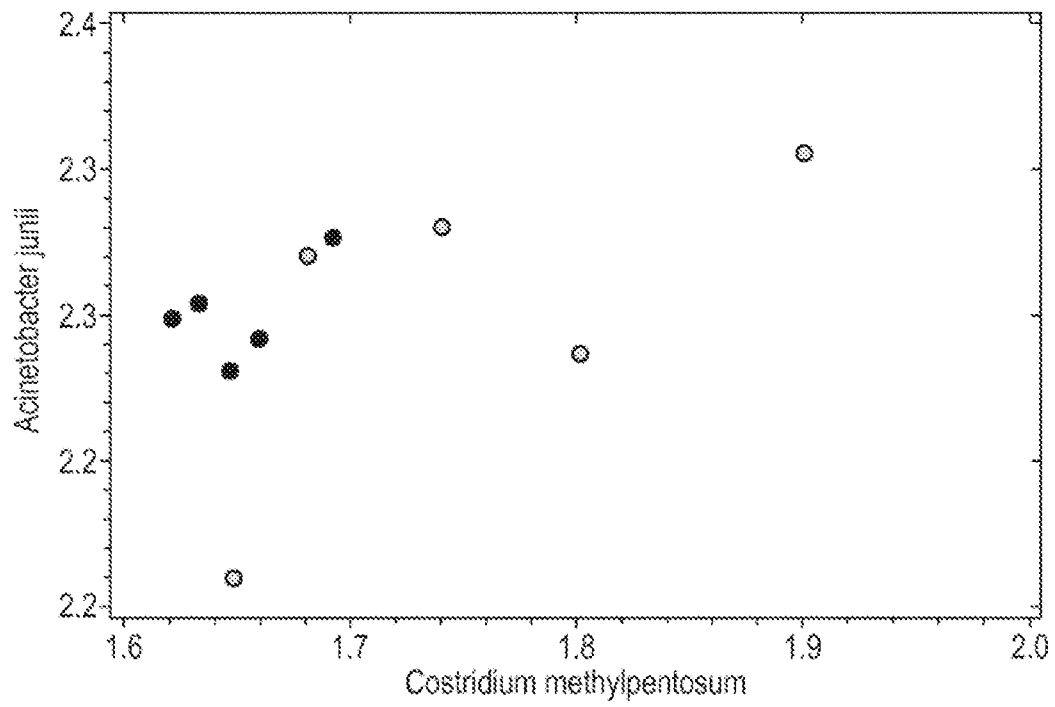


Fig. 8

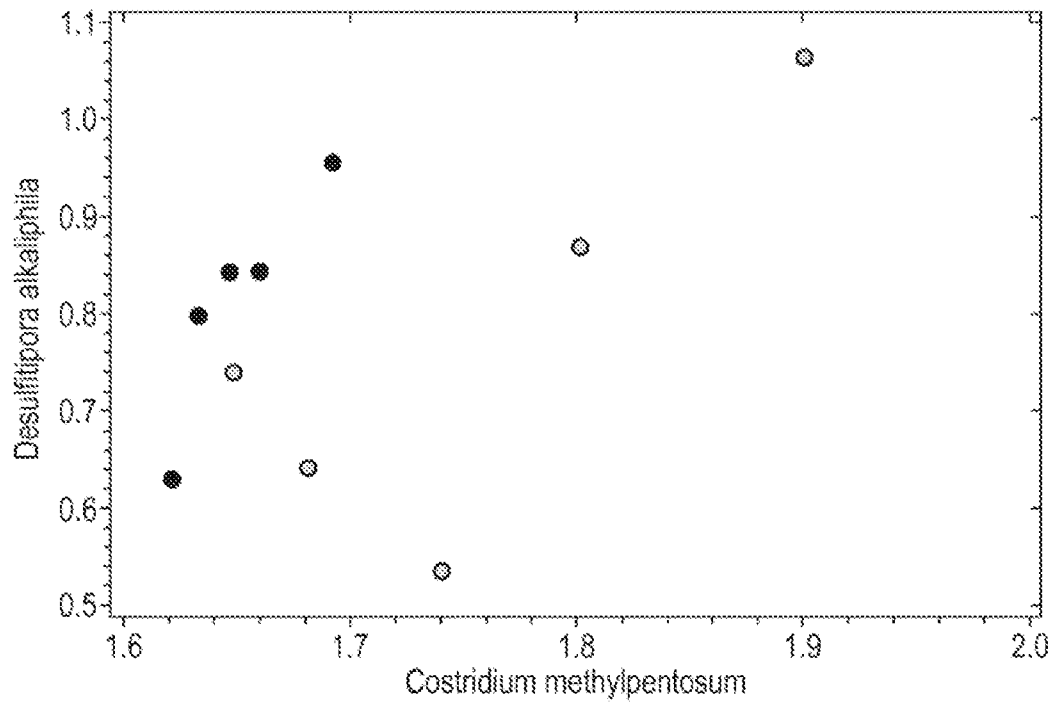


Fig. 9

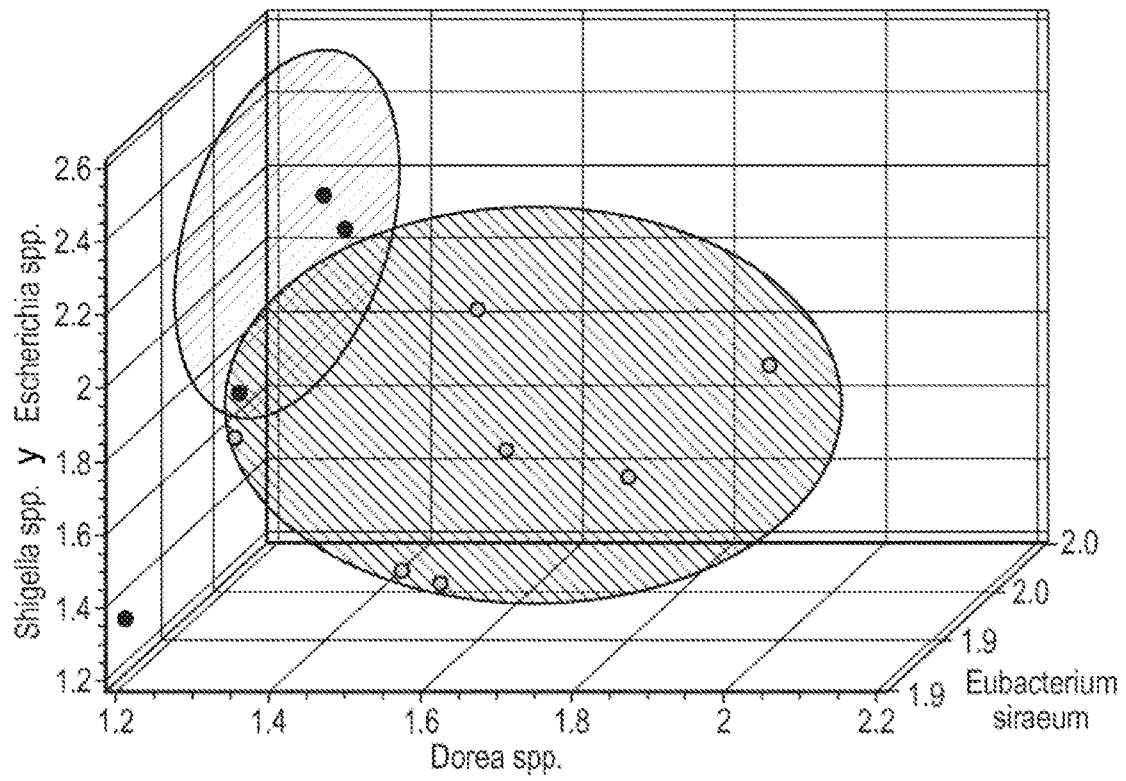


Fig. 10

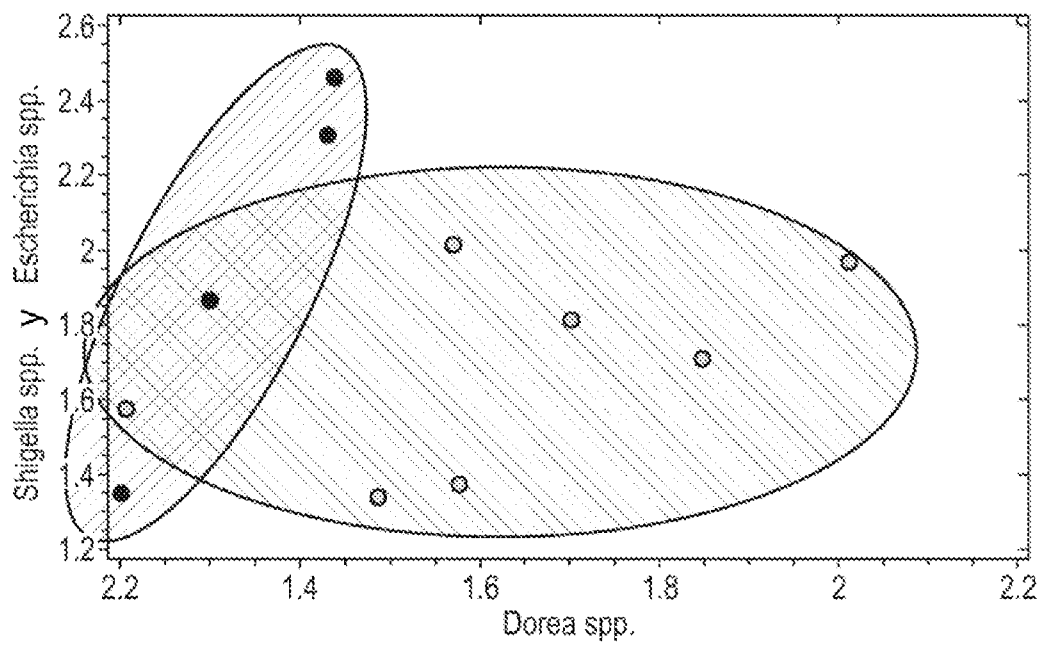


Fig. 11

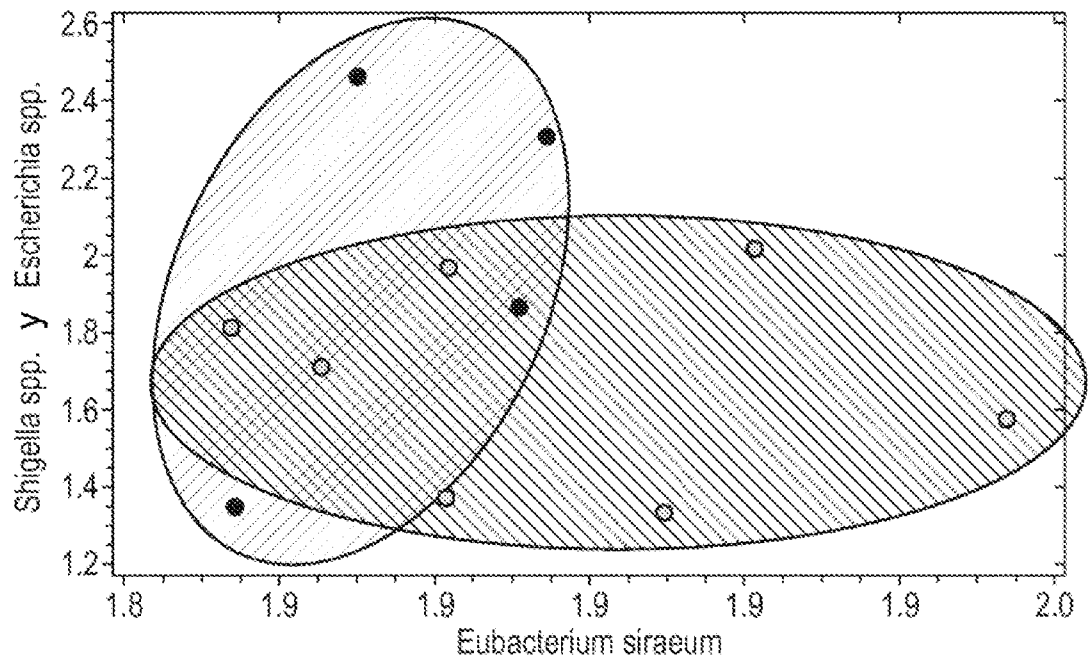


Fig. 12

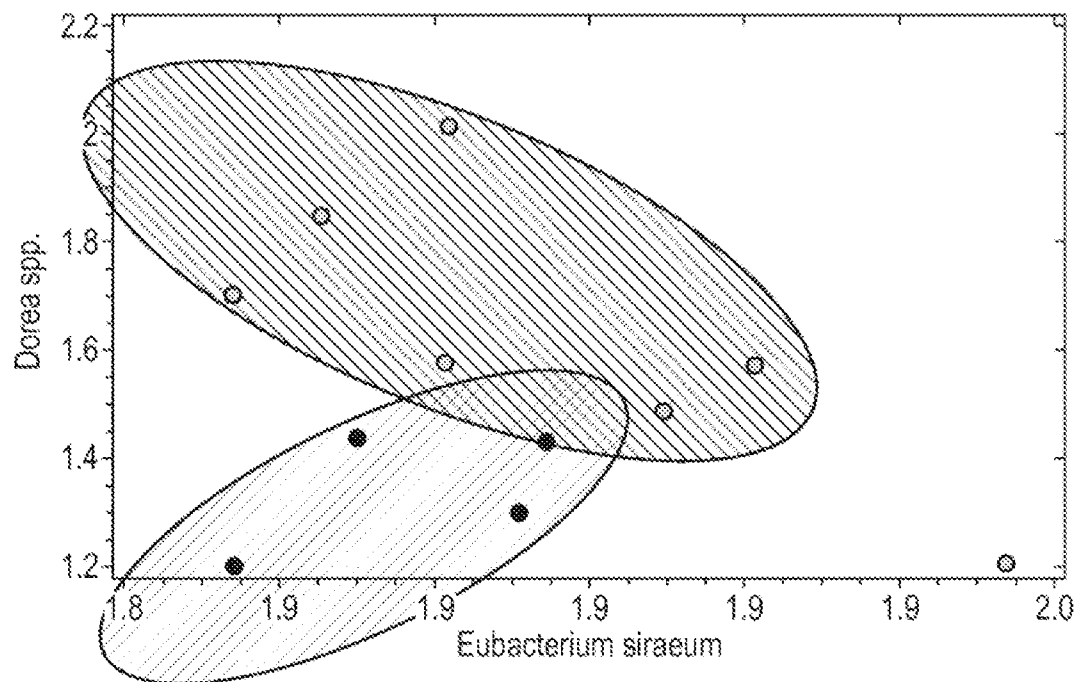


Fig. 13

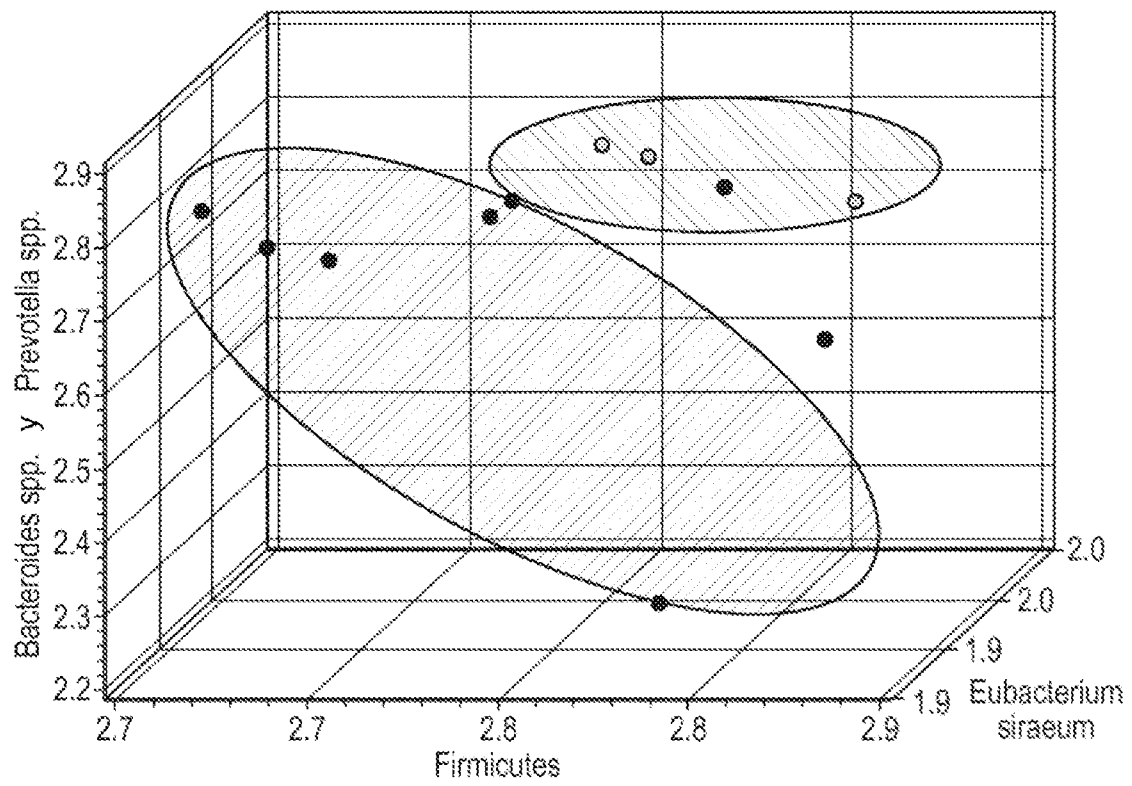


Fig. 14

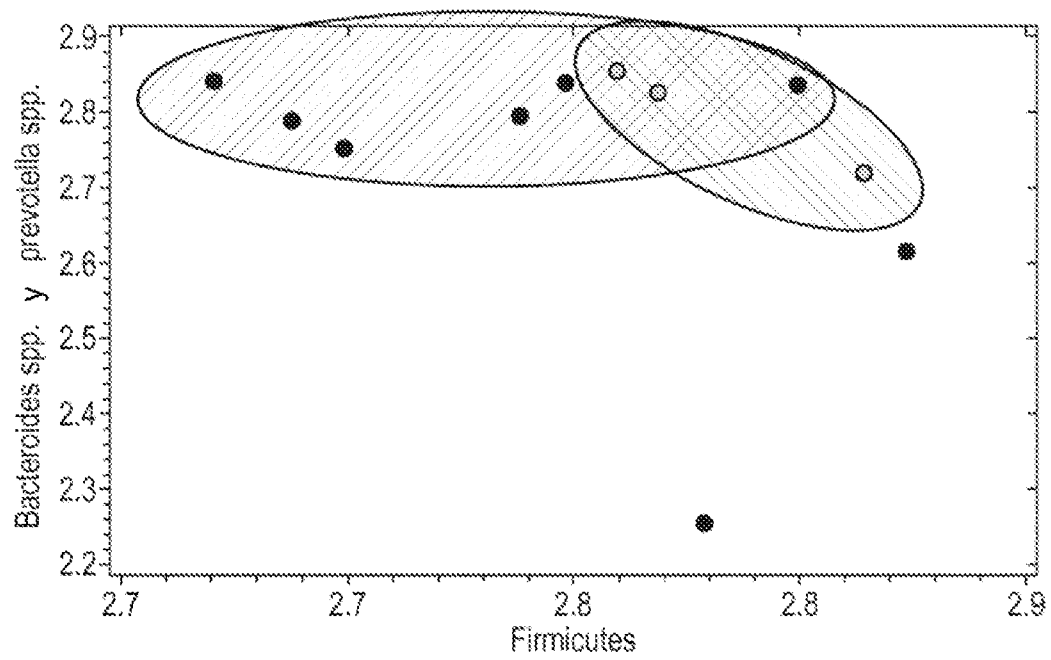


Fig. 15

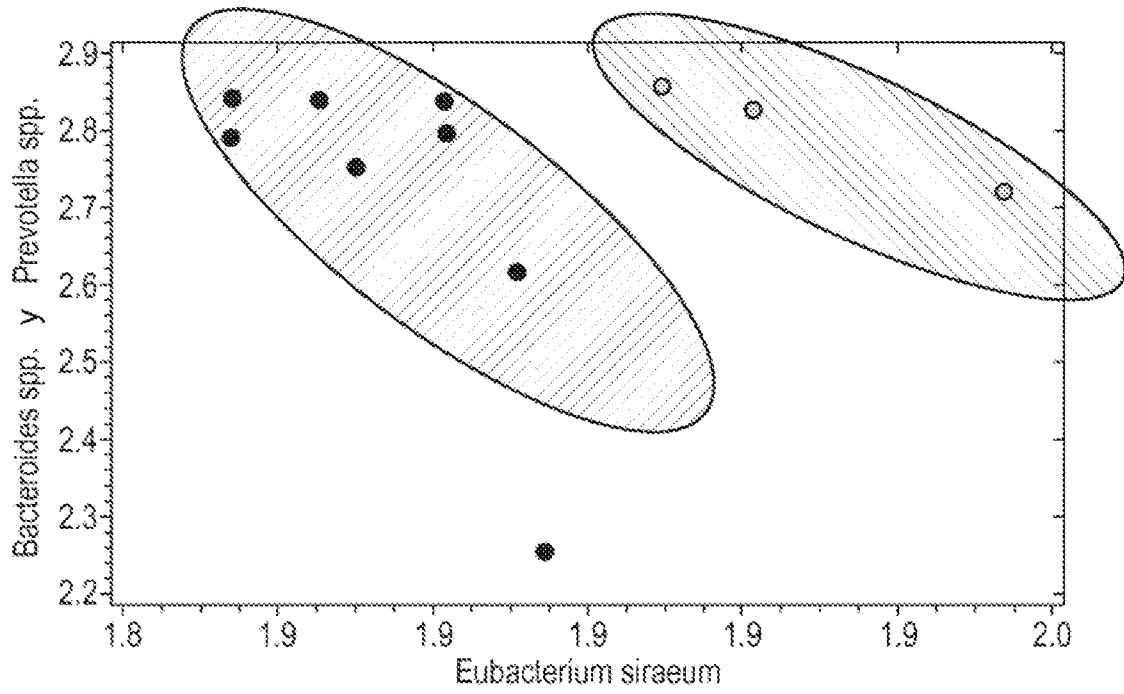


Fig. 16

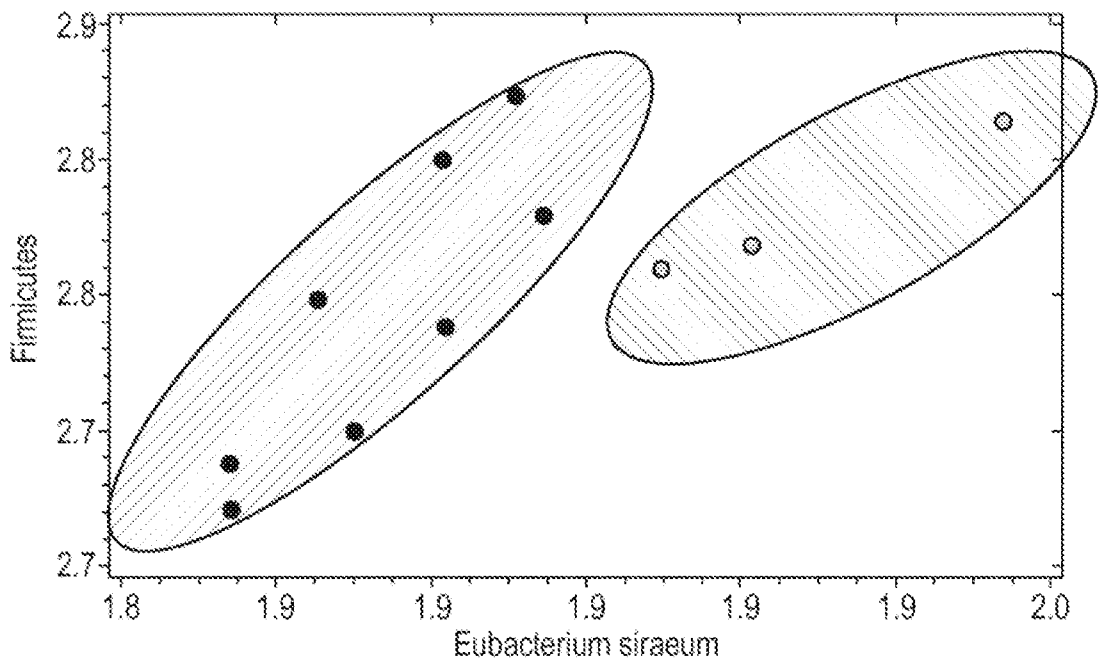


Fig. 17

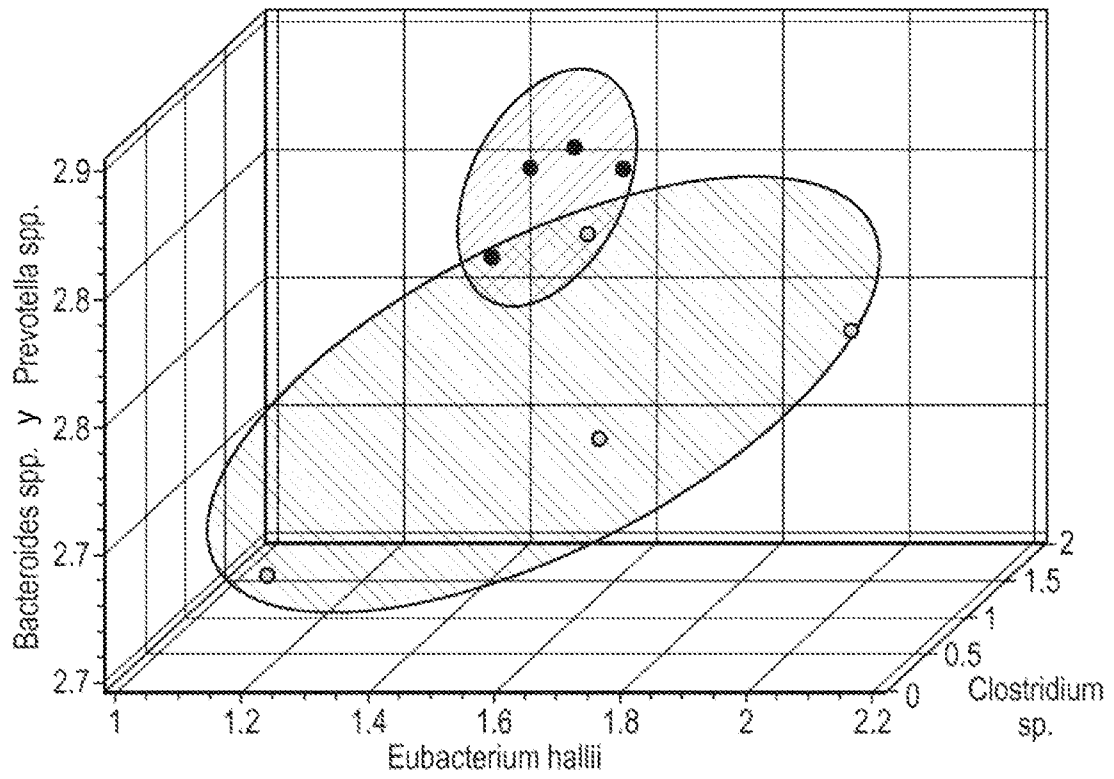


Fig. 18

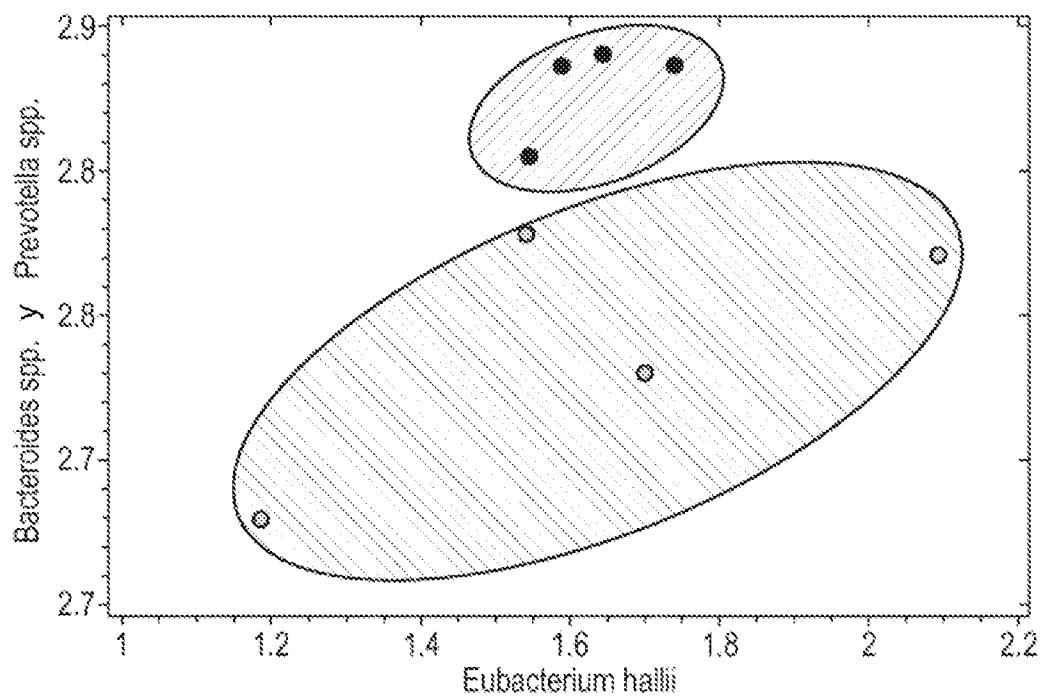


Fig. 19

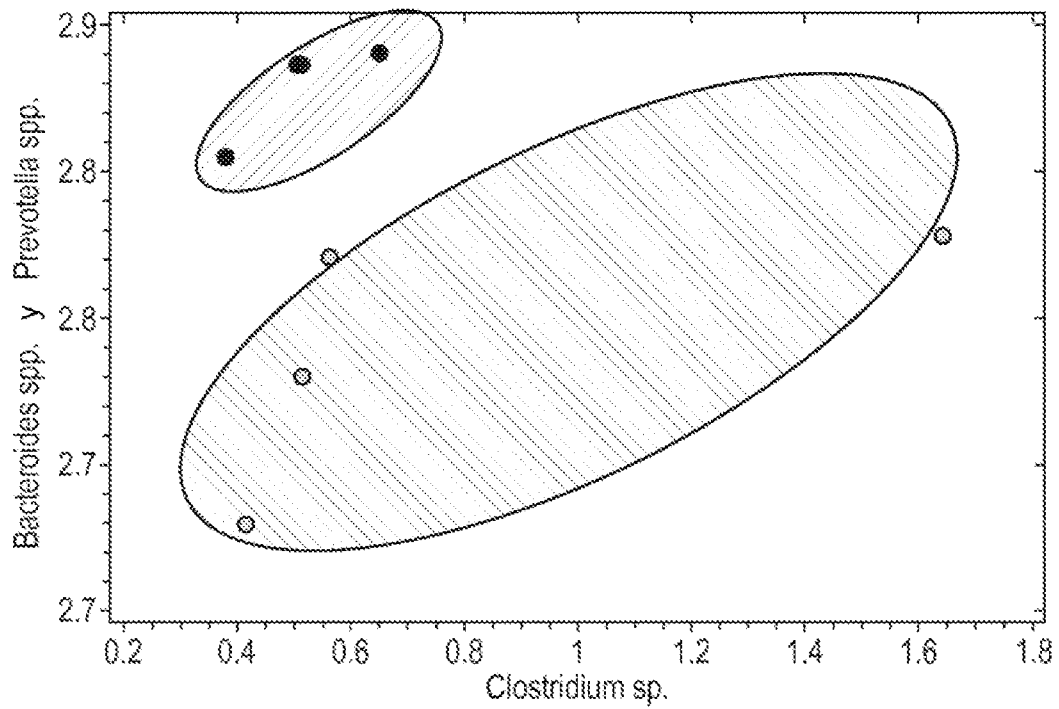


Fig. 20

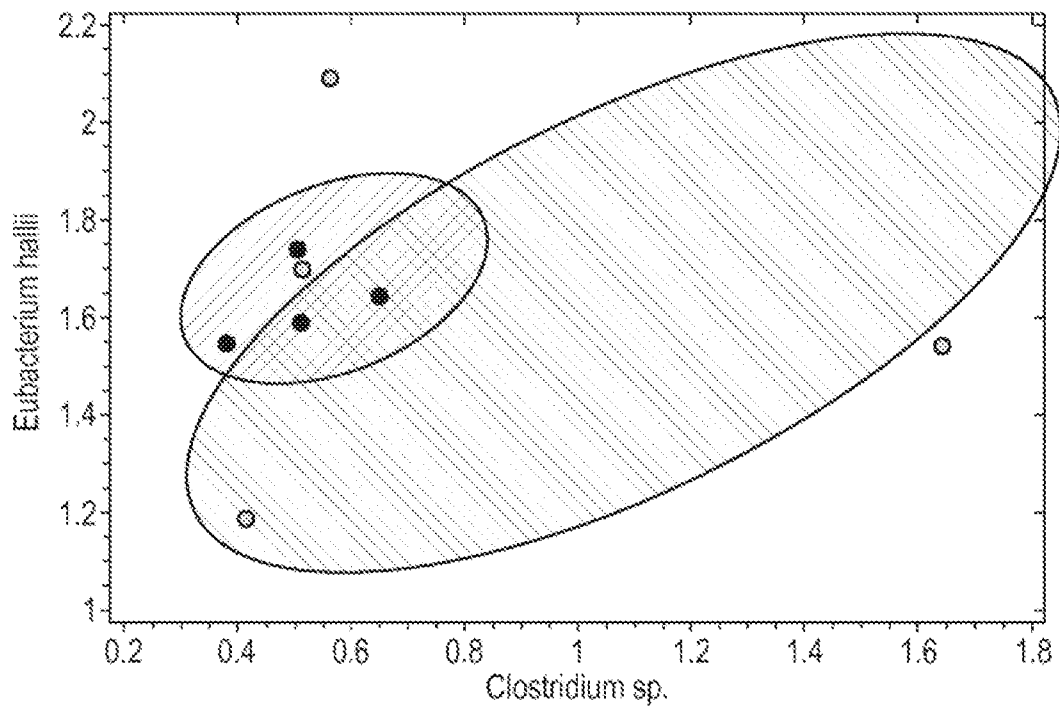


Fig. 21

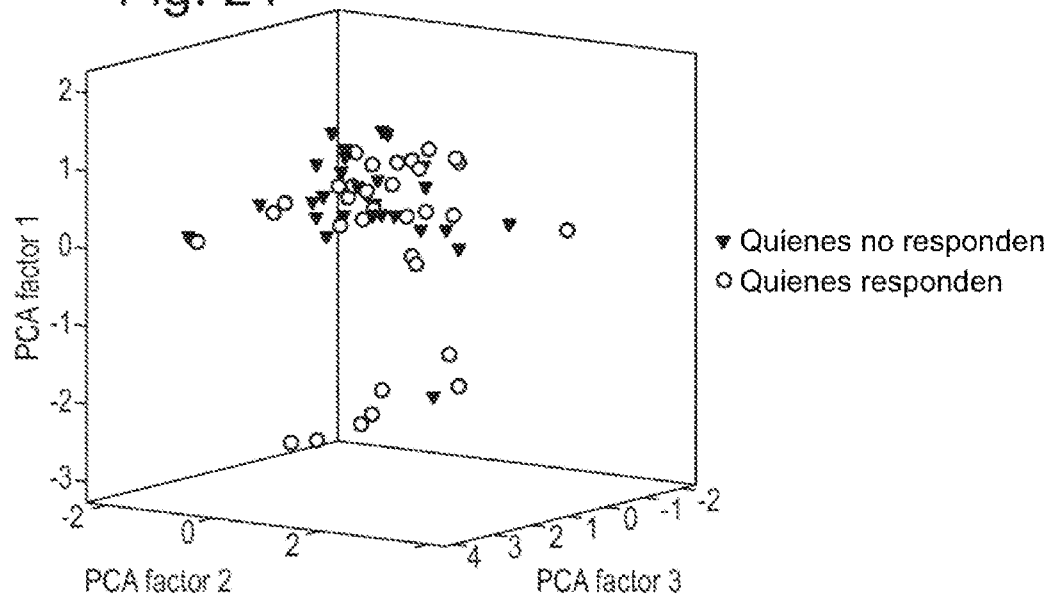


Fig. 22

