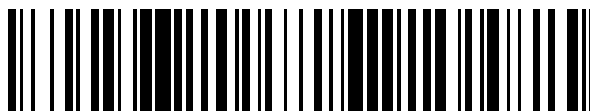


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 088**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2007** **E 07814109 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2015** **EP 2057471**

54 Título: **Métodos para el diagnóstico del síndrome de intestino irritable**

30 Prioridad:

15.08.2006 US 822488 P

10.01.2007 US 884397 P

20.03.2007 US 895962 P

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

20.05.2015

73 Titular/es:

NESTEC S.A. (100.0%)

Avenue Nestlé 55

1800 Vevey, CH

72 Inventor/es:

LOIS, AUGUSTO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 536 088 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para el diagnóstico del síndrome de intestino irritable.

5 ANTECEDENTES

El síndrome del intestino irritable (SII) es el más común de todos los trastornos gastrointestinales, que afecta a un 10-20% de la población general y que representa más del 50% de todos los pacientes con problemas digestivos. Sin embargo, los estudios sugieren que sólo alrededor de 10% a 50% de los afectados por SII realmente buscan atención médica. Los pacientes con SII presentan síntomas dispares como, por ejemplo, dolor abdominal predominantemente relacionado con la defecación, diarrea, estreñimiento o diarrea y estreñimiento alternados, distensión abdominal, gases, y exceso de moco en las heces. Más del 40% de los pacientes con SII tienen síntomas tan graves que tienen que pedir bajas laborales, reducir su vida social, evitar las relaciones sexuales, cancelar citas, dejar de viajar, tomar medicación, e incluso permanecer confinado en su casa por miedo a la vergüenza. El coste estimado de la atención de salud del SII en los Estados Unidos es de 8 mil millones de dólares por año (Talley et al., *Gastroenterol*, 109:1736-1741 (1995)).

La fisiopatología exacta del SII no se entiende bien. Sin embargo, existe una mayor sensibilidad a la percepción del dolor visceral, conocido como sensibilización periférica. Esta sensibilización implica una reducción en el umbral y un aumento en la ganancia de los procesos de transducción de las neuronas aferentes primarias, atribuible a una serie de mediadores que incluyen monoaminas (por ejemplo, catecolaminas e indolaminas), sustancia P, y una serie de citoquinas y prostanoïdes tales como prostaglandinas de tipo E (véase, por ejemplo, Mayer et al., *Gastroenterol.*, 107: 271-293 (1994)). También implicado en la etiopatogenia del SII es la disfunción motora intestinal, lo que conduce a una manipulación anormal de contenidos intraluminales y / o gas (véase, por ejemplo, Kellow et al., *Gastroenterol.*, 92: 1885-1893. (1987); Levitt et al., *Ann. Int. Med.* 124: 422-424 (1996)). Los factores psicológicos también pueden contribuir a los síntomas del SII que aparecen en conjunción con, si es que no se activan por, trastornos como la depresión y la ansiedad (véase, por ejemplo, Drossman et al., *Gastroenterol Int.*, 8: 47-90 (1995)).

Las causas del SII no se comprenden bien. Las paredes de los intestinos están revestidas con capas de músculo que se contraen y relajan mientras se mueven los alimentos desde el estómago a través del tracto intestinal hacia el recto. Normalmente, estos músculos se contraen y se relajan en un ritmo coordinado. En los pacientes con SII, estas contracciones son generalmente más fuertes y duran más tiempo de lo normal. Como resultado, los alimentos se fuerzan a través de los intestinos más rápidamente que en algunos casos causan gas, distensión abdominal y diarrea. En otros casos, ocurre lo contrario: el paso de alimentos se retrasa y la materia fecal se hace dura y seca provocando estreñimiento.

La fisiopatología exacta del SII queda por esclarecer. Mientras que la dismotilidad intestinal y la percepción visceral alterada se consideran importantes contribuyentes a la patogénesis de los síntomas (Quigley, *Scand. J. Gastroenterol.*, 38 (Supl. 237): 1-8 (2003); Mayer et al., *Gastroenterol*, 122: 2032- 2048 (2002)), esta condición se percibe ahora generalmente como un trastorno del eje cerebro-intestinal. Recientemente, también se han propuesto papeles para la infección entérica y la inflamación intestinal. Los estudios han documentado la aparición del SII tras una gastroenteritis confirmada bacteriológicamente, mientras que otros han proporcionado evidencia de inflamación de la mucosa de bajo grado (Spiller et al., *Gut.*, 47: 804-811 (2000); Dunlop et al., *Gastroenterol*, 125: 1651-1659 (2003); Cumberland et al., *Epidemiol. Infect.*, 130: 453-460 (2003)) y la activación inmune (Gwee et al., *Gut*, 52: 523-526 (2003.); Pimentel et al., *Am. J. Gastroenterol.*, 95: 3503 a 3506 (2000)) en el SII. La flora entérica también está implicada, y un estudio reciente ha demostrado la eficacia del organismo probiótico *Bifidobacterium* en el tratamiento de la enfermedad mediante la modulación de la actividad inmune (O'Mahony et al., *Gastroenterol*, 128: 541-551 (2005)).

El eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) es el núcleo del sistema de estrés endocrino en los seres humanos (De Wied et al., *Front. Neuroendocrinol.*, 14: 251-302 (1993)) y proporciona un vínculo importante entre el cerebro y el sistema inmune intestinal. La activación del eje tiene lugar en respuesta a ambos factores estresantes físicos y psicológicos (Dinan, *Br. J. Psychiatry*, 164: 365-371 (1994)), ambos han sido implicados en la fisiopatología del SII (Cumberland et al., *Epidemiol. Infect.*, 130: 453-460 (2003)). Los pacientes con SII se han descrito por tener una mayor tasa de abuso sexual y físico en la infancia, junto con mayores tasas de eventos estresantes de la vida en la edad adulta (Gaines et al., *Baillieres Clin. Gastroenterol.*, 13: 437-452 (1999)). Tal trauma psicosocial o mala estrategia de afrontamiento cognitivo afecta profundamente la gravedad de los síntomas, el funcionamiento diario, y los resultados de salud.

Aunque la etiología del SII no está completamente caracterizada, la comunidad médica ha desarrollado una definición de consenso y los criterios, conocidos como los criterios de Roma II, para ayudar en el diagnóstico del SII en base a la historia del paciente. Los criterios de Roma II requieren tres meses de dolor abdominal continuo o recurrente o malestar en un período de un año que se alivia con la defecación y / o asociado con un cambio en la frecuencia de las deposiciones o consistencia, así como dos o más de los siguientes: frecuencia de heces alterada, forma de las heces alterada, paso de las heces alterada, paso de mucosidad o hinchazón y distensión

abdominal. La ausencia de alteraciones estructurales o bioquímicas que podrían estar causando los síntomas es también una condición necesaria. Como resultado, los criterios de Roma II se pueden usar sólo cuando hay un historial sustancial del paciente y es fiable sólo cuando no hay anatomía intestinal anormal o proceso metabólico que de otra manera expliquen los síntomas. Del mismo modo, los criterios de Roma III desarrollados recientemente por la comunidad médica se pueden utilizar sólo cuando se presentan un conjunto específico de síntomas, una detallada historia clínica del paciente y un examen físico.

Dinan et al. (2006) *Gastroenterology*, 130: 304-311 muestra que el cortisol y las citoquinas proinflamatorias interleucina IL-6 (junto con su receptor soluble) e IL-8 estaban elevados en todos los subgrupos de SII (es decir, diarrea predominante, estreñimiento y alternadores), con el grupo estreñido siendo el más elevado. No hubo alteración en los niveles de IL-10. Se realizó el análisis estadístico, aunque no hay estudios sobre el uso de un algoritmo de aprendizaje estadístico.

Piche et al. (2005) *Gastroenterology*, 128 (4) Supl. 2 A623 muestra que la fatiga está asociada con los niveles de leptina séricos elevados en pacientes con hepatitis C: Existe otro estudio en que la leptina fue mayor en los pacientes LBS en comparación con los controles (30,6 +/- 25,6 vs. 18,2 +/- 12,6 ng / mL, $p = 0,04$). También hay una correlación entre la puntuación total de la fatiga y la leptina. Sin embargo, no hay ningún estudio sobre la combinación de marcadores o el uso de un algoritmo de aprendizaje estadístico.

WO 01111334 muestra que SI80, SII, fibromialgia, síndrome de fatiga crónica, depresión, TDAH, o una enfermedad autoinmune puede ser diagnosticado con ASCA. Un ejemplo muestra que ASCA es indicativo de la enfermedad de Crohn, que es una forma de enfermedad inflamatoria intestinal (EII no SII). No hay ninguna mención de IHS en los datos. Además, no hay ningún estudio sobre la utilización de un algoritmo de aprendizaje estadístico.

Está bien documentado que el diagnóstico de un paciente que tiene SII puede ser un reto debido a la similitud en los síntomas entre el SII y otras enfermedades o trastornos. De hecho, debido a que los síntomas del SII son similares o idénticos a los síntomas de muchas otras enfermedades intestinales, pueden pasar años antes de que se haga un diagnóstico correcto. Por ejemplo, los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII), pero que presentan signos y síntomas tales como hinchazón, diarrea, estreñimiento y dolor abdominal leve, pueden ser difíciles de distinguir de los pacientes con SII. Como resultado, la similitud en los síntomas entre el SII y la EII hace difícil un diagnóstico rápido y preciso. La dificultad en el diagnóstico diferencial del SII y EII dificulta el tratamiento temprano y eficaz de estas enfermedades. Desafortunadamente, los métodos de diagnóstico rápidos y precisos para distinguir definitivamente SII de otras enfermedades intestinales o trastornos que se presentan con síntomas similares no están actualmente disponibles. La presente invención satisface esta necesidad y proporciona ventajas relacionadas.

RESUMEN

La invención se refiere a un método para clasificar si una muestra de un individuo se asocia con el síndrome del intestino irritable (SII), comprendiendo dicho método:

(a) determinar un perfil de marcador de diagnóstico mediante la detección de la presencia o el nivel del marcador de diagnóstico TNF relacionado con el inductor débil de la apoptosis (TWEAK) en dicha muestra, y

(b) clasificar dicha muestra como una muestra con SII o muestra sin SII utilizando un algoritmo basado en dicho perfil de marcador de diagnóstico, en el que dicho algoritmo es un sistema clasificador estadístico de aprendizaje entrenado por una cohorte de muestras que comprenden muestras sanas, muestras de SII, muestras de EII y / o muestras celíacas.

El paso (a) puede comprender además detectar la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico seleccionado del grupo que consiste de un factor de crecimiento, anticuerpos anti-neutrófilos, anticuerpo anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), anticuerpo antimicrobiano, lactoferrina, anticuerpos anti-transglutaminasa tisular (tTG), lipocalina, metaloproteinasas de matriz (MMP), inhibidor tisular de la metaloproteinasa (TIMP), alfa-globulina, proteína fragmentadora de actina, proteína S100, fibrinopéptido, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), taquiquinina, grelina, neurotensina, hormona liberadora de corticotropina, y combinaciones de los mismos en dicha muestra.

El paso (a) puede comprender además detectar la presencia de una citoquina seleccionada del grupo que consiste de IL-8, IL-1 β , leptina, osteoprotegerina (OPG), MIP-3 β , GRO α , CXCL4/PF-4, CXCL7/NAP-2, y combinaciones de los mismos.

El factor de crecimiento se puede seleccionar del grupo que consiste de factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de pigmento derivado del epitelio (PEDF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), anfi-regulina (SDGF), y combinaciones de los mismos.

El anticuerpo anti-neutrófilos se puede seleccionar del grupo que consiste de un anticuerpo citoplásmico anti-neutrófilo (ANCA), anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos perinucleares (pANCA), y combinaciones de los mismos.

- 5 El ASCA se puede seleccionar del grupo que consiste de ASCA-IgA, ASCA-IgG, y combinaciones de los mismos.

Anticuerpo antimicrobiano puede seleccionarse del grupo que consiste de un anticuerpo anti-proteína C de membrana externa (anti-OmpC), anticuerpos anti-flagelina, anticuerpo anti-I2, y combinaciones de los mismos.

- 10 En una realización adicional del método de la invención

- 15 a) dicha lipocalina se selecciona entre el grupo que consiste en lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL), un complejo NGAL/MMP-9, y combinaciones de los mismos;
b) dicha MMP es MMP-9;
c) dicho TIMP es TIMP-1; y
d) dicha globulina alfa se selecciona entre el grupo que consiste en alfa-2-macroglobulina, haptoglobina, orosomucoide, y combinaciones de los mismos.

- 20 El paso (a) puede comprender además detectar la presencia de un marcador de diagnóstico seleccionado del grupo de BDNF, NGAL, GRO α , IL-1 β , TIMP-1, ASCA-IgA, anticuerpo anti-CBIR-1 flagelina, ANCA, tTG y combinaciones de los mismos.

- 25 El perfil de marcador de diagnóstico se puede determinar mediante la detección de la presencia o nivel de al menos dos, tres, cuatro, cinco, o seis marcadores de diagnóstico.

- 30 El método puede comprender determinar dicho perfil de marcador de diagnóstico en combinación con un perfil de síntomas, en el que el perfil de los síntomas se determina mediante la identificación de la presencia o la gravedad de al menos un síntoma en dicho individuo; y clasificar dicha muestra como una muestra de SII o muestra sin SII utilizando un algoritmo basado en dicho perfil de marcador de diagnóstico y dicho perfil de síntomas.

La muestra puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en suero, plasma, sangre entera, y heces.

- 35 El algoritmo puede comprender un algoritmo estadístico, tal como un sistema clasificador estadístico de aprendizaje, en el que dicho sistema clasificador estadístico de aprendizaje se selecciona del grupo que consiste de bosque aleatorio, árbol de clasificación y regresión, árbol de decisión, red neuronal, máquina de soporte vectorial, modelo detector de interacción automática de chi-cuadrado general, árbol interactivo, *spline* de regresión multiadaptativa, clasificador de aprendizaje automático, y combinaciones de los mismos.

- 40 El método puede comprender además clasificar dicha muestra sin SII como una enfermedad normal, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), o muestra sin EII.

- 45 El método puede comprender además clasificar dicha muestra SII como una muestra SII-estreñimiento (SII-E), muestra SII-diarrea (SII-D), muestra SII- mixta (SII-M), muestra SII-alterna (SII-A), o muestra SII post-infecciosa (SII-PI).

- 50 Se describen también métodos, sistemas, y el código para clasificar con precisión si una muestra de un individuo se asocia con el síndrome del intestino irritable (SII). Se describen métodos útiles para clasificar una muestra de un individuo como una muestra del SII usando un algoritmo estadístico y / o de datos empíricos. Se describen también métodos útiles para descartar una o más enfermedades o trastornos que se presentan con síntomas similares a SII e incluirlos en SII mediante una combinación de algoritmos estadísticos y / o datos empíricos. Así, el método descrito proporciona una predicción de diagnóstico preciso del SII y la información de pronóstico útil para guiar las decisiones de tratamiento.

- 55 Se describe un método para la clasificación de si una muestra de un individuo se asocia con SII, el método comprende:

- 60 (a) determinar un perfil de marcador de diagnóstico mediante la detección de la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra; y

(b) la clasificación de la muestra como una muestra con SII o muestra sin SII usando un algoritmo basado en el perfil de marcador de diagnóstico.

- 65 Se describe que el perfil de marcador de diagnóstico se determina detectando la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico seleccionado del grupo que consiste de una citoquina, factor de crecimiento,

anticuerpos anti-neutrófilos, anticuerpo anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA), anticuerpo antimicrobiano, lactoferrina, anticuerpo anti-transglutaminasa tisular (tTG), lipocalina, metaloproteinasas de matriz (MMP), inhibidor tisular de la metaloproteinasa (TIMP), alfa-globulina, proteína fragmentadora de actina, proteína S100, fibrinopéptido, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), taquiquinina, grelina, neurotensina, hormona liberadora de corticotropina, y combinaciones de los mismos.

Se describe también un método para clasificar si una muestra de un individuo se asocia con SII, el método comprende:

(a) determinar un perfil de marcador de diagnóstico mediante la detección de la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico seleccionado del grupo que consiste de una citoquina, factor de crecimiento, anticuerpos anti-neutrófilos, ASCA, anticuerpo antimicrobiano, lactoferrina, anticuerpos anti-tTG, lipocalina, MMP, TIMP, alfa-globulina, proteína fragmentadora de actina, proteína S100, fibrinopéptido, CGRP, taquiquinina, grelina, neurotensina, hormona liberadora de corticotropina, y combinaciones de los mismos en la muestra; y

(b) la clasificación de la muestra como una muestra de SII o muestra sin SII usando un algoritmo basado en el perfil de marcador de diagnóstico.

La presencia o nivel de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o más de los biomarcadores que se muestran en la Tabla 1 pueden ser detectados para generar un perfil de marcador de diagnóstico que es útil para predecir el SII. En ciertos casos, los biomarcadores descritos en el presente documento se analizan usando un inmunoensayo tal como un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico.

Tabla 1. Ejemplos de marcadores de diagnóstico adecuados para su uso en la clasificación de SII.

Familia	Biomarcador
Citoquinas	CXCL8 / IL-8
	IL-1 β
	relacionada con el TNF inductor débil de la apoptosis (TWEAK)
	leptina
	Osteoprotegerina (OPG)
	CCL19 / MIP-3 β
	CXCL1 / GRO1 / GRO α
	CXCL4/PF-4
Factor de crecimiento	CXCL7/NAP-2
	Factor de crecimiento epidérmico (EGF)
	factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)
	factor derivado del epitelio pigmentario-(PEDF)
	factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)
anticuerpo anti-neutrófilos	factor de crecimiento derivado de schwannoma (SDGF) / anfirregulina
	anticuerpos anti-neutrófilos citoplasmáticos (ANCA)
ASCA	anticuerpos anti-neutrófilos de citoplasma perinuclear (pANCA)
	ASCA-IgA
anticuerpos antimicrobianos	ASCA-IgG
	anticuerpo anti-proteína C de membrana externa (OmpC)
Lipocalina	anticuerpo Anti-CBIR-1 flagelina
MMP	lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL)
TIMP	MMP-9
alfa-globulina	TIMP-1
	alfa-2-macroglobulina (α 2-MG)
	precursor-2 alfa de haptoglobina (Hp α 2)
proteína fragmentadora de actina	orosomucoide
	gelsolina
proteína S100	Calgranulina A/S100A8/MRP-8
Fibrinopéptido	Fibrinopéptido A (FIBA)
Otros	lactoferrina
	anticuerpo anti-transglutaminasa tisular(tTG)
	péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)

El método de gobernar en el SII puede comprender la determinación de un perfil de marcador de diagnóstico, opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas, en el que el perfil de síntomas se determina mediante

la identificación de la presencia o la gravedad de al menos un síntoma en el individuo; y clasificar la muestra como una muestra con SII o muestra sin SII usando un algoritmo basado en el perfil de marcador de diagnóstico y el perfil de los síntomas.

El perfil de síntomas se determina típicamente mediante la identificación de la presencia o la gravedad de al menos un síntoma seleccionado del grupo que consiste en dolor de pecho, incomodidad en el pecho, ardor de estómago, sensación de plenitud incómoda después de una comida de tamaño medio, incapacidad para terminar una comida de tamaño medio, dolor abdominal, malestar abdominal, estreñimiento, diarrea, hinchazón, distensión abdominal, pensamientos o sentimientos negativos asociados a tener dolor o malestar y combinaciones de los mismos.

La presencia o la gravedad de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más de los síntomas descritos en el presente documento pueden ser identificados para generar un perfil de síntomas que es útil para predecir el SII. En ciertos casos, se utiliza un cuestionario u otra forma de encuesta escrita, verbal, o por teléfono para generar el perfil de síntomas. El cuestionario o encuesta típicamente comprende un conjunto estandarizado de preguntas y respuestas con el fin de recabar información de los encuestados respecto a sus síntomas actuales y / o recientes relacionados con el SII.

El perfil de síntomas puede generarse mediante la compilación y / o el análisis de la totalidad o una parte de las respuestas a las preguntas que figuran en el cuestionario o encuesta. El perfil de los síntomas también puede generarse en base a la respuesta del individuo a la siguiente pregunta: "¿Está usted actualmente experimentando algún síntoma?". El perfil de síntomas generado se puede utilizar en combinación con un perfil de marcador de diagnóstico en los métodos basados en algoritmos descritos en el presente documento para mejorar la exactitud de la predicción del SII.

También se describe un método para clasificar si una muestra de un individuo se asocia con SII, el método comprende:

(a) determinar un perfil de marcador de diagnóstico mediante la detección de la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra;

(b) clasificar la muestra como una muestra con EII o muestra sin EII usando un primer algoritmo estadístico basado en el perfil de marcador de diagnóstico; y
si la muestra se clasifica como una muestra sin EII,

(c) clasificar la muestra sin EII como una muestra con SII o muestra sin SII usando un segundo algoritmo estadístico basado en el mismo perfil de marcador de diagnóstico tal como se determina en el paso (a) o un perfil de marcador de diagnóstico diferente.

El perfil de marcador de diagnóstico se puede determinar mediante la detección de la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico seleccionado del grupo que consiste de una citoquina, factor de crecimiento, anticuerpos anti-neutrófilos, ASCA, anticuerpo antimicrobiano, lactoferrina, anticuerpo anti-tTG, lipocalina, MMP, TIMP, alfa-globulina, proteína fragmentadora de actina, proteína S100, fibrinopéptido, CGRP, taquiquinina, grelina, neurotensina, hormona liberadora de corticotropina, y combinaciones de los mismos.

Se describe el método de descartar primero EII y luego confirmar el SII que comprende determinar un perfil de marcador de diagnóstico en combinación con un perfil de síntomas, en el que el perfil de síntomas se determina mediante la identificación de la presencia o la gravedad de al menos un síntoma en el individuo; clasificar la muestra como una muestra con EII o muestra sin EII utilizando un primer algoritmo estadístico basado en el perfil de marcador de diagnóstico y el perfil de los síntomas; y si la muestra se clasifica como una muestra sin EII, clasificar la muestra sin EII como una muestra de SII o muestra sin SII usando un segundo algoritmo estadístico basado en los mismos perfiles según lo determinado en el paso (a) o diferentes perfiles.

En otro aspecto, se describe un método para el seguimiento de la progresión o regresión del SII en un individuo, comprendiendo el método:

(a) determinar un perfil de marcador de diagnóstico mediante la detección de la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra; y

(b) determinar la presencia o la gravedad del SII en el individuo utilizando un algoritmo basado en el perfil de marcador de diagnóstico.

Se describe que el perfil de marcador de diagnóstico se determina detectando la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico seleccionado del grupo que consiste de una citoquina, factor de crecimiento, anticuerpos anti-neutrófilos, ASCA, anticuerpo antimicrobiano, lactoferrina, anticuerpo anti-tTG, lipocalina, MMP,

TIMP, alfa-globulina, proteína fragmentadora de actina, proteína S100, fibrinopéptido, CGRP, taquiquinina, grelina, neurotensina, hormona liberadora de corticotropina, y combinaciones de los mismos.

5 Se describe que el método de control de la progresión o regresión del SII comprende la determinación de un perfil de marcador de diagnóstico, opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas, en el que el perfil de síntomas se determina mediante la identificación de la presencia o la gravedad de al menos un síntoma en el individuo; y determinar la presencia o la gravedad del SII en el individuo utilizando un algoritmo basado en el perfil de marcador de diagnóstico y el perfil de los síntomas.

10 En un aspecto relacionado, se describe un método para el seguimiento de la eficacia del fármaco en un individuo que recibe un fármaco útil para el tratamiento de SII, comprendiendo el método:

(a) determinar un perfil de marcador de diagnóstico mediante la detección de la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra; y

15 (b) determinar la eficacia del fármaco usando un algoritmo basado en el perfil de marcador de diagnóstico.

20 El perfil de marcador de diagnóstico se puede determinar mediante la detección de la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico seleccionado del grupo que consiste de una citoquina, factor de crecimiento, anticuerpos anti-neutrófilos, ASCA, anticuerpo antimicrobiano, lactoferrina, anticuerpo anti-tTG, lipocalina, MMP, TIMP, alfa-globulina, proteína fragmentadora de actina, proteína S100, fibrinopéptido, CGRP, taquiquinina, grelina, neurotensina, hormona liberadora de corticotropina, y combinaciones de los mismos.

25 El método de monitorización de la eficacia del fármaco para el SII también puede comprender la determinación de un perfil de marcador de diagnóstico, opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas, en el que el perfil de síntomas se determina mediante la identificación de la presencia o la gravedad de al menos un síntoma en el individuo; y la determinación de la eficacia del fármaco usando un algoritmo basado en el perfil de marcador de diagnóstico y el perfil de los síntomas.

30 En un aspecto adicional, se describe un medio legible por ordenador incluyendo el código para controlar uno o más procesadores para clasificar si una muestra de un individuo se asocia con SII, el código que comprende:

35 instrucciones para aplicar un proceso estadístico a un conjunto de datos que comprende un perfil de marcador de diagnóstico para producir una decisión derivada estadísticamente que clasifica la muestra como una muestra con SII o muestra sin SII con base en el perfil de marcador de diagnóstico, en el que el perfil de marcador de diagnóstico indica la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra.

40 El perfil de marcador de diagnóstico puede indicar la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico seleccionado del grupo que consiste de una citoquina, factor de crecimiento, anticuerpos anti-neutrófilos, ASCA, anticuerpo antimicrobiano, lactoferrina, anticuerpo anti-tTG, lipocalina, MMP, TIMP, alfa-globulina, proteína fragmentadora de actina, proteína S100, fibrinopéptido, CGRP, taquiquinina, grelina, neurotensina, hormona liberadora de corticotropina, y combinaciones de los mismos.

45 El medio legible por ordenador para confirmar el SII puede comprender instrucciones para aplicar un proceso estadístico a un conjunto de datos que comprende un perfil de marcador de diagnóstico, opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas que indica la presencia o la gravedad de al menos un síntoma en el individuo para producir una decisión derivada estadísticamente que clasifica la muestra como una muestra del SII o una muestra sin SII con base en el perfil de marcador de diagnóstico y el perfil de los síntomas.

50 En un aspecto relacionado, un medio legible por ordenador se describe incluyendo el código para controlar uno o más procesadores para clasificar si una muestra de un individuo se asocia con SII, el código comprende:

55 (a) instrucciones para aplicar un primer proceso estadístico a un conjunto de datos que comprende un perfil de marcador de diagnóstico para producir una decisión derivada estadísticamente que clasifica la muestra como una muestra con EII o muestra sin EII basado en el perfil de marcador de diagnóstico, en el que el perfil de marcador de diagnóstico indica la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra; y si la muestra se clasifica como una muestra sin EII,

60 (b) instrucciones para aplicar un segundo proceso estadístico al mismo grupo de datos o uno diferente para producir una segunda decisión derivada estadísticamente que clasifica la muestra sin EII como una muestra con SII o muestra sin SII.

65 El perfil de marcador de diagnóstico puede indicar la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico seleccionado del grupo que consiste de una citoquina, factor de crecimiento, anticuerpos anti-neutrófilos, ASCA, anticuerpo antimicrobiano, lactoferrina, anticuerpo anti-tTG, lipocalina, MMP, TIMP, alfa-globulina, proteína

fragmentadora de actina, proteína S100, fibrinopéptido, CGRP, taquiquinina, grelina, neurotensina, hormona liberadora de corticotropina, y combinaciones de los mismos.

El medio legible por ordenador para descartar primero la EII y después confirmar el SII puede comprender instrucciones para aplicar un primer proceso estadístico a un conjunto de datos que comprende un perfil marcador diagnóstico opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas que indica la presencia o la gravedad de al menos uno de los síntomas en el individuo para producir una decisión derivada estadísticamente que clasifica la muestra como una muestra con EII o muestra sin EII basado en el perfil de marcador de diagnóstico y el perfil de los síntomas; y si la muestra se clasifica como una muestra sin EII, instrucciones para aplicar un segundo proceso estadístico al mismo grupo de datos o uno diferente para producir una segunda decisión derivada estadísticamente que clasifica la muestra sin EII como una muestra con SII o muestra sin SII.

En un aspecto adicional, se describe un sistema para clasificar si una muestra de un individuo se asocia con SII, dicho sistema comprende:

(a) un módulo de adquisición de datos configurado para producir un conjunto de datos que comprende un perfil de marcador de diagnóstico, en el que el perfil marcador de diagnóstico indica la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra;

(b) un módulo de procesamiento de datos configurado para procesar el conjunto de datos mediante la aplicación de un proceso estadístico al conjunto de datos para producir una decisión derivada estadísticamente que clasifica la muestra como una muestra con SII o muestra sin SII con base en el perfil de marcador de diagnóstico; y

(c) un módulo de pantalla configurada para mostrar la decisión derivada estadísticamente.

El perfil de marcador de diagnóstico puede indicar la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico seleccionado del grupo que consiste de una citoquina, factor de crecimiento, anticuerpos anti-neutrófilos, ASCA, anticuerpo antimicrobiano, lactoferrina, anticuerpo anti-tTG, lipocalina, MMP, TIMP, alfa-globulina, proteína fragmentadora de actina, proteína S100, fibrinopéptido, CGRP, taquiquinina, grelina, neurotensina, hormona liberadora de corticotropina, y combinaciones de los mismos.

El sistema para confirmar el SII puede comprender también un módulo de adquisición de datos configurado para producir un conjunto de datos que comprende un perfil de marcador de diagnóstico, opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas que indica la presencia o la gravedad de al menos un síntoma en el individuo; un módulo de procesamiento de datos configurado para procesar el conjunto de datos mediante la aplicación de un proceso estadístico para el conjunto de datos para producir una decisión derivada estadísticamente que clasifica la muestra como una muestra con SII o muestra sin SII con base en el perfil de marcador de diagnóstico y el perfil de los síntomas; y un módulo de pantalla configurada para mostrar la decisión derivada estadísticamente.

En un aspecto relacionado, se describe un sistema para clasificar si una muestra de un individuo se asocia con SII, dicho sistema comprende:

(a) un módulo de adquisición de datos configurado para producir un conjunto de datos que comprende un perfil de marcador de diagnóstico, en el que el perfil marcador de diagnóstico indica la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra;

(b) un módulo de procesamiento de datos configurado para procesar el conjunto de datos mediante la aplicación de un primer proceso estadístico para el conjunto de datos para producir una primera decisión derivada estadísticamente que clasifica la muestra como una muestra con EII o muestra sin EII basado en el perfil de marcador de diagnóstico; si la muestra se clasifica como una muestra sin EII, un módulo de procesamiento de datos configurado para aplicar un segundo proceso estadístico al mismo grupo de datos o a uno diferente para producir una segunda decisión derivada estadísticamente para clasificar la muestra sin EII como una muestra con SII o muestra sin SII; y

(c) un módulo de pantalla configurada para mostrar la primera y / o la segunda decisión derivada estadísticamente.

El perfil de marcador de diagnóstico puede indicar la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico seleccionado del grupo que consiste de una citoquina, factor de crecimiento, anticuerpos anti-neutrófilos, ASCA, anticuerpo antimicrobiano, lactoferrina, anticuerpo anti-tTG, lipocalina, MMP, TIMP, alfa-globulina, proteína fragmentadora de actina, proteína S100, fibrinopéptido, CGRP, taquiquinina, grelina, neurotensina, hormona liberadora de corticotropina, y combinaciones de los mismos.

El sistema para descartar primero la EII y luego confirmar el SII también puede comprender un módulo de adquisición de datos configurado para producir un conjunto de datos que comprende un perfil de marcador de diagnóstico, opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas que indica la presencia o la gravedad de al menos un síntoma en el individuo; un módulo de procesamiento de datos configurado para procesar el conjunto de datos mediante la aplicación de un primer proceso estadístico para el conjunto de datos para producir una primera decisión derivada estadísticamente que clasifica la muestra como una muestra con EII o muestra sin EII basado en el perfil de marcador de diagnóstico y el perfil de los síntomas; Si la muestra se clasifica como una muestra sin EII, un módulo de procesamiento de datos configurado para aplicar un segundo proceso estadístico al mismo grupo de datos o a uno diferente para producir una segunda decisión derivada estadísticamente que clasifica la muestra sin EII como una muestra con SII o muestra sin SII; y un módulo de pantalla configurada para mostrar la primera y / o segunda decisión derivada estadísticamente.

Otros objetos, características y ventajas del método descrito serán evidentes para un experto en la materia a partir de la siguiente descripción detallada y figuras.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 ilustra una ruta molecular derivada de los marcadores del SII identificados y descritos en este documento.

La Figura 2 ilustra un sistema de clasificación de la enfermedad (SCE).

La Figura 3 ilustra un análisis de cuartil de los niveles de leptina en muestras de pacientes con SII y sin SII.

La Figura 4, Panel A ilustra los resultados de un ensayo ELISA donde se midieron los niveles de leptina en las muestras de los pacientes SII-A, SII-C, y el SII-D, así como muestras de pacientes no-SII; Panel B ilustra las diferencias de género en los niveles de leptina en pacientes con SII varones en comparación con los pacientes con SII femeninos.

La Figura 5 ilustra un análisis de cuartil de los niveles de TWEAK en muestras de pacientes con SII y sin SII.

La Figura 6 ilustra un análisis de cuartil (Figura 6A) y el análisis de histograma con porcentaje acumulativo (Figura 6B) en los niveles de IL-8 en muestras de pacientes con SII y sin SII. Distribución dot plot con barras = mediana $\pm$ rango intercuartil mostrando distribuciones del 25%, 50% y 75% de cada población de pacientes.

La Figura 7 ilustra un segundo análisis de histograma con porcentaje acumulativo en los niveles de IL-8 en muestras de pacientes con SII y sin SII.

La Figura 8 ilustra los resultados de un ensayo ELISA donde se midieron los niveles de IL-8 en las muestras de los pacientes SII-A, SII-C, y SII-D, así como muestras de pacientes de control sanos.

La Figura 9 ilustra un análisis de cuartiles (Figura 9A) y análisis de histograma con porcentaje acumulativo (Figura 9B) de los niveles de EGF en muestras de pacientes con SII y sin SII. Distribución dot plot con barras = mediana $\pm$ rango intercuartil mostrando distribuciones del 25%, 50% y 75% de cada población de pacientes.

La Figura 10 ilustra un análisis de cuartil de los niveles de NGAL en muestras de pacientes con SII y sin SII.

La Figura 11 ilustra un análisis de cuartil de los niveles de MMP-9 niveles en muestras de pacientes con SII y sin SII.

La Figura 12 ilustra un análisis de cuartiles de los niveles del complejo NGAL/MMP-9 en muestras de pacientes con SII y sin SII.

La Figura 13 ilustra un análisis de cuartiles de los niveles de sustancia P en muestras de pacientes con SII y sin SII.

La Figura 14 ilustra un análisis de histograma con porcentaje acumulativo utilizando lactoferrina como un ejemplo no limitativo.

La Figura 15 ilustra un diagrama de flujo para un algoritmo de modelo de muestras utilizada para la clasificación de SII.

La Figura 16 ilustra el conjunto de datos obtenidos utilizando el modelo de la figura 15.

La figura 17 ilustra una red neural.

La Figura 18 ilustra la distribución de muestras con SII y sin SII antes y después de modelar con un algoritmo aleatorio forestal. 0 = son SII; 1 = SII.

La Figura 19 ilustra un árbol de clasificación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Introducción

El diagnóstico de un paciente con síndrome del intestino irritable (SII) puede ser un reto debido a la similitud en los síntomas entre el SII y otras enfermedades o trastornos. Por ejemplo, los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII), pero que muestran signos leves y síntomas tales como hinchazón, diarrea, estreñimiento y dolor abdominal pueden ser difíciles de distinguir de los pacientes con SII. Como resultado, la similitud en los síntomas entre el SII y la EII hace difícil el diagnóstico rápido y preciso y dificulta el tratamiento temprano y eficaz de la enfermedad.

El método descrito se basa, en parte, tras el sorprendente descubrimiento de que la exactitud de la clasificación de una muestra biológica de un individuo como una muestra de SII se puede mejorar sustancialmente mediante

la detección de la presencia o nivel de ciertos marcadores de diagnóstico (por ejemplo, citoquinas, factores de crecimiento, anticuerpos anti-neutrófilos, anticuerpos anti-Saccharomyces cerevisiae, anticuerpos antimicrobianos, lactoferrina, etc.), solos o en combinación con la identificación de la presencia o la gravedad de los síntomas relacionados con SII sobre la base de la respuesta del individuo a una o más preguntas (por ejemplo, "¿Está experimentando algún síntoma en la actualidad?"). La Figura 1 muestra un ejemplo no limitativo de una vía molecular derivada de los marcadores del SII identificados y descritos en este documento. En algunos aspectos, el método descrito utiliza algoritmos estadísticos para ayudar en la clasificación de una muestra como una muestra con SII o una muestra sin SII. En otros aspectos, el método descrito utiliza algoritmos estadísticos para descartar otros trastornos intestinales (por ejemplo, EII), y después clasificar la muestra sin EII para ayudar en la clasificación del SII.

II. Definiciones

Tal como se utiliza en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuye a menos que se especifique lo contrario.

El término "clasificación" incluye "asociar" o "categorizar" una muestra con un estado de enfermedad. En ciertos casos, "clasificación" se basa en la evidencia estadística, la evidencia empírica, o ambos. Se describe que los métodos y sistemas de clasificación utilizan un denominado conjunto de entrenamiento de muestras que tienen estados de enfermedad conocidos. Una vez establecido, el conjunto de datos de entrenamiento sirve como base, modelo o plantilla contra la que se comparan las características de una muestra desconocida, con el fin de clasificar el estado de enfermedad desconocida de la muestra. En ciertos casos, la clasificación de la muestra es similar a diagnosticar el estado de enfermedad de la muestra. En otros casos, la clasificación de la muestra es similar a diferenciar el estado de enfermedad de la muestra de otro estado de enfermedad.

El término "síndrome de intestino irritable" o "SII" incluye un grupo de trastornos funcionales del intestino caracterizado por uno o más síntomas, incluyendo, pero sin limitarse a, dolor abdominal, incomodidad abdominal, cambio en el patrón intestinal, movimientos intestinales sueltos o más frecuentes, diarrea y estreñimiento, por lo general en ausencia de cualquier anomalía estructural aparente. Hay por lo menos tres formas de SII, dependiendo de qué síntoma predomina: (1) con predominancia de diarrea (SII-D); (2) con predominancia de estreñimiento (SII-E); y (3) SII con alternancia del patrón de heces (SII-A). El SII también puede producirse en forma de una mezcla de síntomas (SII-M). También hay varios subtipos clínicos del SII, como SII post infecciosa (SII-PI).

El término "muestra" incluye cualquier muestra biológica obtenida de un individuo. Las muestras adecuadas incluyen, sin limitación, sangre entera, plasma, suero, saliva, orina, heces, esputo, lágrimas, cualquier otro fluido corporal, muestras de tejido (por ejemplo, biopsia), y los extractos celulares de los mismos (por ejemplo, extracto celular arterial). La muestra puede ser una muestra de suero. El uso de muestras tales como suero, saliva, y orina es bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Hashida et al., J. Clin. Lab. Anal., 11:267-86 (1997)). Un experto en la técnica apreciará que las muestras tales como muestras de suero se pueden diluir antes del análisis de los niveles de marcadores.

El término "biomarcador" o "marcador" incluye cualquier marcador de diagnóstico, como un marcador bioquímico, marcador serológico, marcador genético, u otra característica clínica o ecográfica que se puede utilizar para clasificar una muestra de un individuo como una muestra de SII o para descartar una o más enfermedades o trastornos asociados con síntomas similares a SII en una muestra de un individuo. El término "biomarcador" o "marcador" también abarca cualquier marcador de clasificación, tal como un marcador bioquímico, marcador serológico, marcador genético, u otra característica clínica o ecográfica que se puede utilizar para clasificar SII en una de sus diversas formas o subtipos clínicos. Los ejemplos no limitantes de marcadores de diagnóstico se describen a continuación e incluyen citoquinas, factores de crecimiento, anticuerpos anti-neutrófilos, anticuerpos anti-Saccharomyces cerevisiae, anticuerpos antimicrobianos, anticuerpos anti-transglutaminasa tisular (tTG), lipocalinas, metaloproteinasas de la matriz (MMP), inhibidor tisular de las metaloproteinasas (TIMP), alfa-globulinas, proteínas fragmentadoras de actina, proteínas S100, fibrinopéptidos, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), taquiquininas, grelina, neurotensina, hormona liberadora de corticotropina (CRH), elastasa, proteína C-reactiva (CRP), lactoferrina, anticuerpos anti-lactoferrina, calprotectina, hemoglobina, NOD2/CARD15, transportador de la recaptación de serotonina (SERT), triptófano hidroxilasa-1, 5-hidroxitriptamina (5-HT), lactulosa, y similares. Ejemplos de marcadores de clasificación incluyen sin limitación, leptina, SERT, triptófano hidroxilasa-1, 5-HT, proteína de la mucosa del antro 8, queratina 8, claudin-8, zonulina, receptor de la hormona liberadora de corticotropina 1 (CRHR1), receptor de la hormona liberadora de corticotropina 2 (CRHR2), y similares. Los marcadores de diagnóstico se pueden utilizar para clasificar el SII en una de sus diversas formas o subtipos clínicos. En otras, los marcadores de clasificación se pueden utilizar para clasificar una muestra como una muestra con SII o para descartar una o más enfermedades o trastornos asociados con síntomas similares al SII. Un experto en la técnica conocerá otros marcadores de diagnóstico y de clasificación adicionales.

Tal como se utiliza aquí, el término "perfil" incluye cualquier conjunto de datos que representa los rasgos distintivos o características asociadas con una enfermedad o trastorno tal como SII o EII. El término abarca un "perfil de marcador de diagnóstico" que analiza uno o más marcadores de diagnóstico en una muestra, un "perfil de síntomas" que identifica uno o más factores clínicos relacionados con el SII (es decir, los síntomas) de un individuo que está experimentando o ha experimentado, y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, un "perfil de marcador de diagnóstico" puede incluir un conjunto de datos que representa la presencia o el nivel de uno o más marcadores de diagnóstico asociados con el SII y / o EII. Asimismo, un "perfil de síntomas" puede incluir un conjunto de datos que representa la presencia, gravedad, frecuencia y / o duración de uno o más síntomas asociados con el SII y / o EII.

El término "individuo", "sujeto" o "paciente" se refiere típicamente a seres humanos, pero también a otros animales, incluyendo, por ejemplo, otros primates, roedores, caninos, felinos, equinos, ovinos, porcinos, y similares.

Tal como se utiliza aquí, el término "sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos" incluye una secuencia de aminoácidos que es similar, pero no idéntica a la secuencia de aminoácidos de origen natural. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que un péptido, polipéptido, o proteína de origen natural puede tener una o más modificaciones tales como adiciones de aminoácidos, deleciones o sustituciones relativas a la secuencia de aminoácidos del péptido, polipéptido, o proteína de origen natural, siempre que la secuencia modificada conserve sustancialmente al menos una actividad biológica del péptido, polipéptido, o proteína de origen natural tales como la inmunorreactividad. Normalmente se realiza una comparación de similitud sustancial entre secuencias de aminoácidos con secuencias entre aproximadamente 6 y 100 residuos, preferiblemente entre aproximadamente 10 y 100 residuos, y más preferiblemente entre aproximadamente 25 y 35 residuos. Una modificación particularmente útil de un péptido, polipéptido o proteína, o un fragmento del mismo, es una modificación que confiere, por ejemplo, una mayor estabilidad. La incorporación de uno o más D-aminoácidos es una modificación útil para aumentar la estabilidad de un polipéptido o fragmento de polipéptido. Del mismo modo, la deleción o sustitución de residuos de lisina puede aumentar la estabilidad mediante la protección del fragmento de polipéptido o polipéptido contra la degradación.

El término "control de la progresión o regresión del SII" incluye el uso de los métodos, sistemas, y el código para determinar el estado de enfermedad (por ejemplo, la presencia o la gravedad del SII) de un individuo. En ciertos casos, los resultados de un algoritmo (por ejemplo, un sistema clasificador estadístico de aprendizaje) se comparan con los resultados obtenidos para el mismo individuo en un momento anterior. Los métodos, sistemas, y el código pueden utilizarse para predecir la progresión del SII, por ejemplo, mediante la determinación de una probabilidad de progreso del SII ya sea rápida o lentamente en un individuo basándose en un análisis de marcadores de diagnóstico y / o la identificación de síntomas o relacionados con SII. Los métodos, sistemas, y el código pueden utilizarse para predecir la regresión de SII, por ejemplo, mediante la determinación de una probabilidad de retroceder para el SII ya sea rápida o lentamente en un individuo basándose en un análisis de marcadores de diagnóstico y / o la identificación de síntomas o relacionados con SII.

El término "control de la eficacia del fármaco en un individuo que recibe un fármaco útil para el tratamiento de SII" incluye el uso de los métodos, sistemas, y el código para determinar la eficacia de un agente terapéutico para el tratamiento del SII después de haberlo administrado. En ciertos casos, los resultados de un algoritmo (por ejemplo, un sistema clasificador estadístico de aprendizaje) se comparan con los resultados obtenidos para el mismo individuo antes del inicio del uso del agente terapéutico o en un momento anterior de la terapia. Tal como se usa en este documento, un fármaco útil para el tratamiento del SII es cualquier compuesto o fármaco utilizado para mejorar la salud de la persona e incluye, sin limitación, fármacos de SII, tales como agentes serotoninérgicos, antidepresivos, activadores del canal de cloruro, bloqueadores de los canales de cloruro, agonistas de la guanilato ciclasa, antibióticos, opioides, antagonistas de neuroquinina, agentes antiespasmódicos o anticolinérgicos, alcaloides de belladona, barbitúricos, análogos al péptido similar al glucagón 1 (GLP-1), antagonistas del factor liberador de corticotropina (CRF), probióticos, bases libres de los mismos, las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, derivados de los mismos, análogos de los mismos, y combinaciones de los mismos.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz o dosis" incluye una dosis de un medicamento que es capaz de lograr un efecto terapéutico en un sujeto en necesidad del mismo. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco útil para el tratamiento del SII puede ser la cantidad que es capaz de prevenir o aliviar uno o más síntomas asociados con SII. La cantidad exacta puede ser comprobada por un experto en la técnica utilizando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms, Vols 1-3 (1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Pickar, Dosage Calculations (1999); y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, Gennaro, Ed, Lippincott, Williams & Wilkins (2003)).

III. Descripciones

Se describen los métodos, sistemas, y el código para clasificar con precisión si una muestra de un individuo se asocia con el síndrome del intestino irritable (SII). El método descrito es útil para clasificar una muestra de un individuo como una muestra con SII usando un algoritmo estadístico (por ejemplo, un sistema clasificador estadístico de aprendizaje) y / o datos empíricos (por ejemplo, la presencia o nivel de un marcador de SII). El método descrito también es útil para descartar una o más enfermedades o trastornos que se presentan con síntomas similares al SII y confirmar el SII utilizando una combinación de algoritmos estadísticos y / o de datos empíricos. En consecuencia, el método descrito proporciona una predicción de diagnóstico preciso del SII y la información de pronóstico útil para guiar las decisiones de tratamiento.

En un aspecto, se describe un método para clasificar si una muestra de un individuo se asocia con SII, el método comprende:

(a) determinar un perfil de marcador de diagnóstico mediante la detección de la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra; y

(b) clasificar la muestra como una muestra con SII o una muestra sin SII usando un algoritmo basado en el perfil de marcador de diagnóstico.

El perfil de marcador de diagnóstico se puede determinar mediante la detección de la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico seleccionado del grupo que consiste de una citoquina, factor de crecimiento, anticuerpos anti-neutrófilos, anticuerpo anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA), anticuerpo antimicrobiano, lactoferrina, anticuerpo anti-transglutaminasa tisular (tTG), lipocalina, metaloproteinasas de matriz (MMP), inhibidor tisular de la metaloproteinasa (TIMP), alfa-globulina, proteína fragmentadora de actina, proteína S100, fibrinopéptido, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), taquiquinina, grelina, neurotensina, hormona liberadora de corticotropina, y combinaciones de los mismos.

La presencia o nivel de al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, o más marcadores de diagnóstico se pueden determinar en la muestra del individuo. En ciertos casos, la citoquina comprende una o más de las citoquinas que se describen a continuación. Preferiblemente, la presencia o el nivel de IL-8, IL-1 β , inductor de apoptosis débil relacionado con TNF (TWEAK), leptina, osteoprotegerina (OPG), MIP-3 β , GRO, CXCL4/PF-4, y / o CXCL7/NAP-2 se determina en la muestra del individuo. En otros casos, el factor de crecimiento comprende uno o más de los factores de crecimiento que se describen a continuación. Preferiblemente, la presencia o el nivel de factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de pigmento derivado del epitelio (PEDF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), y / o anfi-regulina (SDGF) se determina en la muestra del individuo.

En algunos casos, el anticuerpo anti-neutrófilos comprende ANCA, pANCA, cANCA, NSNA, SAPPa, y combinaciones de los mismos. En otros casos, el ASCA comprende ASCA-IgA, ASCA-IgG, ASCA-IgM, y combinaciones de los mismos. En otros casos, el anticuerpo antimicrobiano comprende un anticuerpo anti-OmpC, anticuerpo anti-flagelina, anticuerpo anti-I2, y combinaciones de los mismos.

En ciertos casos, la lipocalina comprende una o más de las lipocalinas que se describen a continuación. Preferiblemente, la presencia o nivel de lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) y / o un complejo de NGAL y una metaloproteinasa de matriz (por ejemplo, complejo NGAL/MMP-9) se determina en la muestra del individuo. En otros casos, la metaloproteinasa de matriz (MMP) comprende una o más de las MMP que se describen a continuación. Preferiblemente, la presencia o el nivel de MMP-9 se determina en la muestra del individuo. En otros casos, el inhibidor tisular de la metaloproteinasa (TIMP) comprende uno o más de los TIMP que se describen a continuación. Preferiblemente, la presencia o nivel de TIMP-1 se determina en la muestra del individuo. En otros ejemplos, la alfa-globulina comprende una o más de las alfa-globulinas que se describen a continuación. Preferiblemente, la presencia o el nivel de alfa-2-macroglobulina, haptoglobina, y / o orosomucoide se determina en la muestra del individuo.

En otros casos, la proteína fragmentadora de la actina comprende uno o más de las proteínas fragmentadoras de actina que se describen a continuación. Preferiblemente, la presencia o nivel de gelsolina se determina en la muestra del individuo. En casos adicionales, la proteína S100 comprende una o más de las proteínas S100 que se describen a continuación, incluyendo, por ejemplo, calgranulina. En aún otros casos, el fibrinopéptido comprende uno o más de los fibrinopéptidos que se describen a continuación. Preferiblemente, la presencia o nivel de fibrinopéptido A (FIBA) se determina en la muestra del individuo. En otros casos, la presencia o nivel de una de las taquiquininas tales como la sustancia P, neuroquinina A, y / o neuroquinina B se determina en la muestra del individuo. La presencia o el nivel de otros marcadores de diagnóstico tales como, por ejemplo, el anticuerpo anti-lactoferrina, L-selectina/CD62L, elastasa, proteína C-reactiva (CRP), calprotectina, autoanticuerpos anti-U1 de 70 kDa, zona occludens 1 (ZO-1), péptido vasoactivo intestinal (VIP), suero amiloide A, y / o gastrina también se pueden determinar.

La muestra utilizada para detectar o determinar la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico es típicamente sangre entera, plasma, suero, saliva, orina, deposiciones (es decir, heces), lágrimas, y cualquier otro fluido corporal, o una muestra de tejido (es decir, biopsia) tal como una muestra de intestino delgado o de colon. Preferiblemente, la muestra es suero, sangre completa, plasma, heces, orina, o una biopsia de tejido. En ciertos casos, los métodos comprenden además la obtención de la muestra del individuo antes de detectar o determinar la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra.

Un panel para la medición de uno o más de los marcadores de diagnóstico descritos anteriormente pueden construirse y utilizarse para clasificar la muestra como una muestra con SII o una muestra sin SII. Un experto en la técnica apreciará que la presencia o el nivel de una pluralidad de marcadores de diagnóstico se pueden determinar simultáneamente o secuencialmente, usando, por ejemplo, una alícuota o dilución de la muestra del individuo. En ciertos casos, el nivel de un marcador diagnóstico en particular en la muestra del individuo se considera elevado cuando es al menos aproximadamente un 25%, 50%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, o 1000% mayor que el nivel del mismo marcador en una muestra comparativa (por ejemplo, una muestra normal, control GI, EII, y / o muestra de la enfermedad celiaca) o de la población de muestras (por ejemplo, mayor que un nivel mediano del mismo marcador en una población de control comparativo de muestras GI, enfermedades normales, EII, y / o celiaca). En otros casos, el nivel de un marcador diagnóstico en particular en la muestra del individuo se considera disminuido cuando es al menos aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% inferior que el nivel del mismo marcador en una muestra comparativa (por ejemplo, una muestra normal, control GI, EII, y / o muestra de la enfermedad celiaca) o de la población de muestras (por ejemplo, inferior a un nivel medio del mismo marcador en una población de control comparativo de muestras GI, enfermedades normales, EII, y / o celiaca).

La presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico pueden determinarse usando un ensayo tal como un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. Ejemplos de ensayos de hibridación adecuados para utilizar en los métodos descritos incluyen, pero no se limitan a, transferencia Northern, dot blotting, protección de RNasa, y una combinación de los mismos. Un ejemplo no limitante de un ensayo basado en la amplificación adecuada para utilizar en los métodos descritos incluye una reacción en cadena de polimerasas transcriptasa inversa (RT-PCR).

La presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico también puede determinarse usando un inmunoensayo o un ensayo inmunohistoquímico. Un ejemplo no limitante de un inmunoensayo adecuado para utilizar en los métodos descritos incluye un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Ejemplos de ensayos inmunohistoquímicos adecuados para utilizar en los métodos descritos incluyen, pero no se limitan a, ensayos de inmunofluorescencia tales como ensayos directos de anticuerpos fluorescentes, ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFA), ensayos de inmunofluorescencia anticomplemento, y ensayos de inmunofluorescencia avidina-biotina. Otros tipos de ensayos inmunohistoquímicos incluyen ensayos de inmunoperoxidasa.

El método para confirmar el SII puede comprender la determinación de un perfil de marcador de diagnóstico, opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas, en el que el perfil de síntomas se determina mediante la identificación de la presencia o la gravedad de al menos un síntoma en el individuo; y clasificar la muestra como una muestra con SII o una muestra sin SII usando un algoritmo basado en el perfil de marcador de diagnóstico y el perfil de los síntomas. Un experto en la técnica apreciará que el perfil de marcador de diagnóstico y el perfil de los síntomas se pueden determinar simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden.

El perfil de síntomas se determina típicamente mediante la identificación de la presencia o la gravedad de al menos un síntoma seleccionado del grupo que consiste en dolor de pecho, incomodidad en el pecho, ardor de estómago, sensación de plenitud incómoda después de una comida de tamaño normal, incapacidad para terminar una comida de tamaño normal, dolor abdominal, malestar abdominal, estreñimiento, diarrea, distensión abdominal, hinchazón, pensamientos o sentimientos negativos asociados a tener dolor o malestar, y sus combinaciones.

La presencia o la gravedad de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más de los síntomas descritos en el presente documento pueden ser identificados para generar un perfil de síntomas que es útil para predecir el SII. En ciertos casos, se utiliza un cuestionario u otra forma de encuesta escrita, verbal, o por teléfono para producir el perfil de síntomas. El cuestionario o encuesta típicamente comprende un conjunto estandarizado de preguntas y respuestas con el fin de recabar información de los encuestados respecto a sus síntomas actuales y/o recientes relacionados con el SII. Por ejemplo, el Ejemplo 13 proporciona preguntas ejemplares que se pueden incluir en un cuestionario para identificar la presencia o la gravedad de uno o más síntomas relacionados con el SII en el individuo.

El perfil de síntomas se puede elaborar mediante la compilación y / o el análisis de la totalidad o una parte de las respuestas a las preguntas que figuran en el cuestionario o encuesta. El perfil de los síntomas también

puede elaborarse en base a la respuesta del individuo a la siguiente pregunta: "¿Está usted experimentado algún síntoma en la actualidad?" El perfil de síntomas generado puede utilizarse en combinación con un perfil de marcador de diagnóstico en los métodos basados en algoritmos descritos en el presente documento para mejorar la exactitud de la predicción del SII.

La clasificación de una muestra como una muestra con SII o muestra sin SII puede basarse en el perfil de marcador de diagnóstico, solo o en combinación con un perfil de síntomas, junto con un algoritmo estadístico. En ciertos casos, el algoritmo estadístico es un sistema clasificador estadístico de aprendizaje. El sistema clasificador estadístico de aprendizaje puede seleccionarse del grupo que consiste de un bosque aleatorio (RF), árbol de clasificación y regresión (C&RT), árbol de decisión, red neural (NN), máquina de vectores de apoyo (SVM), modelo de detección automática interacción general de chi-cuadrado, árbol interactivo, spline de regresión multiadaptativa, máquina clasificadora de aprendizaje, y combinaciones de los mismos. Preferiblemente, el sistema clasificador estadístico de aprendizaje es un algoritmo estadístico basado en árboles (por ejemplo, RF, C&RT, etc.) y/o un NN (por ejemplo, NN artificial, etc.). Ejemplos adicionales de sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje adecuados para su uso en el método descrito se describen en la Patente de Estados Unidos N° 7.943.328.

En ciertos casos, el algoritmo estadístico es un sistema clasificador estadístico de aprendizaje único. Preferiblemente, el sistema clasificador estadístico de aprendizaje único comprende un algoritmo estadístico basado en árboles tal como un RF o C&RT. Como ejemplo no limitativo, un sistema clasificador estadístico de aprendizaje único puede usarse para clasificar la muestra como una muestra con SII o muestra sin SII en base a una predicción o valor de probabilidad y la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico (es decir, perfil de marcador de diagnóstico), solo o en combinación con la presencia o la gravedad de al menos un síntoma (es decir, perfil de síntomas). El uso de un sistema clasificador estadístico de aprendizaje único normalmente clasifica la muestra como una muestra con SII con una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, y / o la precisión global de al menos aproximadamente un 75%, 76%, 77%, 78 %, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%.

En algunos otros casos, el algoritmo estadístico es una combinación de al menos dos sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje. Preferiblemente, la combinación de sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje comprende por ejemplo, un RF y un NN, que se utilizan en tándem o en paralelo. Como un ejemplo no limitativo, un primer RF puede utilizarse para generar un valor de predicción o probabilidad basado en el perfil de marcador de diagnóstico, solo o en combinación con un perfil de síntomas, y a continuación, se puede utilizar un NN para clasificar la muestra como una muestra con SII o una muestra sin SII en base a la predicción o valor de probabilidad y el mismo o diferente perfil de marcador de diagnóstico o combinación de perfiles. Ventajosamente, el sistema híbrido clasificador estadístico de aprendizaje RF / NN clasifica la muestra como una muestra con SII con una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, y / o precisión global de al menos aproximadamente un 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%.

En algunos casos, los datos obtenidos al usar el sistema o sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje pueden procesarse utilizando un algoritmo de procesamiento. Dicho algoritmo de procesamiento se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste de perceptrón multicapa, red de retropropagación, y el algoritmo de Levenberg-Marquardt. En otros casos, se puede utilizar una combinación de tales algoritmos de procesamiento, en un modo paralelo o en serie.

Los métodos de la presente pueden comprender adicionalmente la clasificación de la muestra sin SII como una enfermedad normal, inflamatoria del intestino (EII), o muestra sin EII. La clasificación de la muestra sin SII se puede realizar, por ejemplo, usando al menos uno de los marcadores de diagnóstico descritos anteriormente.

Los métodos de la presente invención también pueden comprender, además, el envío de los resultados de la clasificación del SII a un clínico, por ejemplo, un gastroenterólogo o un médico general. Los métodos descritos proporcionan un diagnóstico en forma de una probabilidad de que el individuo tenga SII. Por ejemplo, el individuo puede tener entre un 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o mayor probabilidad de tener SII. Los métodos pueden proporcionar además un pronóstico del SII en el individuo. Por ejemplo, el pronóstico puede ser la cirugía, el desarrollo de una categoría o subtipo clínico de SII, el desarrollo de uno o más síntomas, o la recuperación de la enfermedad.

El diagnóstico de un individuo que tiene SII puede continuar con la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco útil para el tratamiento de uno o más síntomas asociados con SII. Los medicamentos para el SII adecuados incluyen, pero no se limitan a, agentes serotoninérgicos, antidepresivos, activadores del canal de cloruro, bloqueadores de los canales de cloruro, agonistas de la guanilato ciclasa, antibióticos, agonistas de opioides, antagonistas de neuroquinina, agentes antiespasmódicos o anticolinérgicos, alcaloides de belladona, barbitúricos, análogos de GLP-1, antagonistas de CRF, probióticos, bases libres de los mismos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, derivados de los mismos, análogos de los

5 mismos, y combinaciones de los mismos. Otros fármacos para el SII incluyen agentes de relleno, antagonistas de la dopamina, carminativas, tranquilizantes, dextofisopam, fenitoína, timolol y diltiazem. Adicionalmente, se pueden administrar aminoácidos como la glutamina y ácido glutámico que regulan la permeabilidad intestinal al afectar la señalización celular neuronal o glial para tratar pacientes con SII.

10 Los métodos pueden comprender además la clasificación de la muestra SII como muestra SII-estreñimiento (SII-E), SII-diarrea (SII-D), SII-mixto (SII-M), SII-alterna (SII-A), o SII post-infecciosa (SII-PI). En ciertos casos, la clasificación de la muestra SII en una categoría, la forma, o subtipo clínico del SII se basa en la presencia o nivel de al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más marcadores de clasificación. Los ejemplos no limitantes de marcadores de clasificación se describen a continuación. Preferiblemente, al menos una forma del SII se distingue de al menos otra forma del SII basándose en la presencia o el nivel de leptina. En ciertos casos, los métodos se pueden utilizar para diferenciar una muestra SII-C a partir de una muestra SII-A y / o de la muestra SII-D en un individuo previamente identificado como que tiene SII. En otros casos, los métodos se pueden utilizar para clasificar una muestra de un individuo no diagnosticado previamente con SII como muestra SII-A, muestra SII-C, muestra SII-D, o muestra sin SII.

20 Los métodos pueden comprender además el envío de los resultados de la clasificación a un médico. Los métodos pueden proporcionar además un diagnóstico en forma de una probabilidad de que el individuo tenga SII-A, SII-C, SII-D, SII-M, o SII-PI. Los métodos pueden comprender además la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco útil para el tratamiento de SII-A, SII-C, SII-D, SII-M, o SII-PI. Los fármacos adecuados incluyen, pero no se limitan a, tegaserod (Zelnorm™), alosetrón (Lotronex®), lubiprostona (Aniitza™), rifamixina (Xifaxan™), MD-1100, probióticos, y una combinación de los mismos. En los casos donde la muestra se clasifica como una muestra SII-A o SII-C y / o el individuo es diagnosticado con SII-A o SII-C, se puede administrar al individuo una dosis terapéuticamente eficaz de tegaserod u otro agonista de 5-HT4 (por ejemplo, mosaprida, renzaprida, AG1-001, etc.). En algunos casos, cuando la muestra se clasifica como SII-C y / o la persona es diagnosticada con SII-C, se puede administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de lubiprostona u otro activador del canal de cloruro, rifamixina u otro antibiótico capaz de controlar el sobrecrecimiento bacteriano intestinal, MD-1100 u otro agonista de la guanilato ciclasa, asimadolina u otro agonista opiode, o talnetant u otro antagonista de la neuroquinina. En otros casos, cuando la muestra se clasifica como SII-D y / o el individuo es diagnosticado con SII-D, se pueden administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de alosetrón u otro antagonista de 5-HT3 (por ejemplo, ramosetrón, DDP-225, etc.), crofelemer u otro bloqueador de canal de cloruro, talnetant u otro antagonista de la neuroquinina (por ejemplo, saredutant, etc.), o un antidepresivo tal como un antidepresivo tricíclico.

35 Los métodos pueden comprender además, el descarte de la inflamación intestinal. Los ejemplos no limitantes de inflamación intestinal incluyen la inflamación aguda, diverticulitis, anastomosis ileal-bolsa anal, colitis microscópica, diarrea infecciosa, y combinaciones de los mismos. En algunos casos, la inflamación intestinal se descarta basándose en la presencia o nivel de proteína C-reactiva (CRP), lactoferrina, calprotectina, o combinaciones de los mismos.

40 En otro aspecto, se describe un método para la clasificación de si una muestra de un individuo se asocia con SII, el método comprende:

45 (a) determinar un perfil de marcador de diagnóstico mediante la detección de la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra;

(b) la clasificación de la muestra como una muestra con EII o muestra sin EII usando un primer algoritmo estadístico basado en el perfil de marcador de diagnóstico; y si la muestra se clasifica como una muestra sin EII,

50 (c) la clasificación de la muestra sin EII como una muestra con SII o muestra sin SII usando un segundo algoritmo estadístico basado en el mismo perfil de marcador de diagnóstico tal como se determina en el paso (a) o un perfil de marcador de diagnóstico diferente.

55 El perfil de marcador de diagnóstico se puede determinar mediante la detección de la presencia o nivel de al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, o más marcadores de diagnóstico seleccionado del grupo que consiste en una citoquina (por ejemplo, IL-8, IL-1β, TWEAK, leptina, OPG, MIP-3β, GROα, CXCL4/PF-4, y / o CXCL7/NAP-2), un factor de crecimiento (por ejemplo, EGF, VEGF, PEDF, BDNF, y / o SDGF), un anticuerpo anti-neutrófilos (por ejemplo, ANCA, pANCA, cANCA, NSNA, y / o SAPPa), un ASCA (por ejemplo, ASCA-IgA, ASCA-IgG, y / o ASCA-IgM), un anticuerpo antimicrobiano (por ejemplo, anticuerpo anti-OmpC, anticuerpo anti-flagelina, y / o anticuerpo anti-12), lactoferrina, el anticuerpo anti-tTG, lipocalina (por ejemplo, NGAL, complejo NGAL/MMP-9), MMP (por ejemplo, MMP-9), TIMP (por ejemplo, TIMP-1), alfa-globulina (por ejemplo, alfa-2-macroglobulina, haptoglobina, y / o orosomucoide), proteína fragmentadora de actina (por ejemplo, gelsolina), proteína S100 (por ejemplo, calgranulina), fibrinopéptido (por ejemplo, FIBA), CGRP, taquiquinina (por ejemplo, sustancia P), grelina, neurotensina, hormona liberadora de corticotropina, y combinaciones de los mismos. También se puede determinar la presencia o el nivel de otros marcadores de

diagnóstico tales como, por ejemplo, el anticuerpo anti-lactoferrina, L-selectina/CD62L, elastasa, proteína C-reactiva (CRP), calprotectina, autoanticuerpos anti-U1 de 70 kDa, zona occludens 1 (ZO-1), péptido vasoactivo intestinal (VIP), suero amiloide A, y / o gastrina.

- 5 Los marcadores de diagnóstico utilizados para descartar la EII pueden ser los mismos que los marcadores de diagnóstico utilizados para descartar el SII. Alternativamente, los marcadores de diagnóstico utilizados para descartar la EII pueden ser diferentes de los marcadores de diagnóstico utilizados para confirmar el SII.

10 La muestra utilizada para detectar o determinar la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico es típicamente sangre entera, plasma, suero, saliva, orina, deposiciones (es decir, heces), lágrimas, y cualquier otro fluido corporal, o una muestra de tejido (es decir, biopsia) tal como una muestra de intestino delgado o de colon. Preferiblemente, la muestra es suero, sangre completa, plasma, heces, orina, o una biopsia de tejido. En ciertos casos, los métodos comprenden además la obtención de la muestra del individuo antes de detectar o determinar la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra.

15 Se puede construir un panel para la medición de uno o más de los marcadores de diagnóstico descritos anteriormente y utilizarlo para descartar EII y / o confirmar el SII. Un experto en la técnica apreciará que la presencia o el nivel de una pluralidad de marcadores de diagnóstico se pueden determinar simultáneamente o secuencialmente, usando, por ejemplo, una alícuota o dilución de la muestra del individuo. Como se describió anteriormente, el nivel de un marcador de diagnóstico en particular en la muestra del individuo se considera generalmente elevado cuando es al menos aproximadamente un 25%, 50%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, o 1000% mayor que el nivel del mismo marcador en una muestra comparativa o población de muestras (por ejemplo, mayor que un nivel medio). Del mismo modo, el nivel de un marcador diagnóstico en particular en la muestra del individuo se considera normalmente bajo cuando es al menos aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 25 40%, 45 %, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% inferior que el nivel del mismo marcador en una muestra comparativa o de la población de muestras (por ejemplo, inferior que el nivel medio).

30 En ciertos casos, la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico se determina usando un ensayo tal como un ensayo de hibridación o un ensayo basado en la amplificación. Ejemplos de ensayos de hibridación y ensayos basados en la amplificación adecuados para su uso en los métodos descritos se han descrito anteriormente. En algunos casos, la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico se determina usando un inmunoensayo o un ensayo inmunohistoquímico. Ejemplos de inmunoensayos y ensayos inmunohistoquímicos adecuados para utilizar en los métodos descritos anteriormente no son limitantes.

35 El método para descartar primero la EII (es decir, la clasificación de la muestra como una muestra con EII o muestra sin EII) y luego confirmar el SII (es decir, la clasificación de la muestra sin EII como una muestra con SII o muestra sin SII) puede comprender la determinación de un perfil de marcador de diagnóstico, opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas, en el que el perfil de síntomas se determina mediante la identificación de la presencia o la gravedad de al menos un síntoma en el individuo; la clasificación de la muestra como una muestra con EII o muestra sin EII utilizando un primer algoritmo estadístico basado en el perfil de marcador de diagnóstico y el perfil de los síntomas; y si la muestra se clasifica como una muestra sin EII, la clasificación de la muestra sin EII como una muestra con SII o muestra sin SII usando un segundo algoritmo estadístico basado en los mismos perfiles según lo determinado en el paso (a) o diferentes perfiles. Un experto en la técnica apreciará 45 que el perfil de marcador de diagnóstico y el perfil de los síntomas se pueden determinar simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden.

El primer algoritmo estadístico puede ser un sistema clasificador estadístico de aprendizaje seleccionado del grupo que consiste de un bosque aleatorio (RF), árbol de regresión y clasificación (C&RT), árbol de decisión, 50 red neural (NN), máquina de vector de soporte (SVM), modelo de detección de interacción automática general de chi-cuadrado, árbol interactivo, *spline* de regresión multiadaptativa, clasificador de aprendizaje automático, y sus combinaciones. En ciertos casos, el primer algoritmo estadístico es un sistema clasificador estadístico de aprendizaje único. Preferiblemente, el sistema clasificador estadístico de aprendizaje único comprende un algoritmo estadístico basado en árboles tal como un RF o C&RT. En otros casos, el primer algoritmo estadístico es una combinación de al menos dos sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje, por ejemplo, utilizados 55 en tándem o en paralelo. Como ejemplo no limitativo, una primera RF puede utilizarse para generar un valor de predicción o probabilidad basado en el perfil de marcador de diagnóstico, solo o en combinación con un perfil de síntomas, y un NN (por ejemplo, NN artificial), entonces se puede utilizar para clasificar la muestra, tal como una muestra sin EII o muestra con EII en base a la predicción o valor de probabilidad y el mismo o diferente perfil de marcador de diagnóstico o combinación de perfiles. El sistema clasificador estadístico híbrido de aprendizaje RF/NN normalmente clasifica la muestra como una muestra sin EII con una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, y / o precisión global de al menos aproximadamente un 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94 %, 95%, 60 96%, 97%, 98%, o 99%.

65

El segundo algoritmo estadístico también puede comprender cualquiera de los sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje descritos anteriormente. En ciertos casos, el segundo algoritmo estadístico es un sistema clasificador estadístico de aprendizaje único, tales como, por ejemplo, un algoritmo estadístico basado en árboles (por ejemplo, RF o C&RT). En otros casos, el segundo algoritmo estadístico es una combinación de al menos dos sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje, por ejemplo, utilizados en tándem o en paralelo. Como un ejemplo no limitativo, una primera RF puede utilizarse para generar un valor de predicción o probabilidad basado en el perfil de marcador de diagnóstico, solo o en combinación con un perfil de síntomas, y un NN (por ejemplo, NN artificial) o SVM pueden utilizarse entonces para clasificar la muestra sin SII como una muestra sin SII o muestra con SII en base a la predicción o valor de probabilidad y el mismo o diferente perfil de marcador de diagnóstico o combinación de perfiles. El sistema clasificador estadístico de aprendizaje híbrido RF/NN o RF/SVM descrito en el presente documento normalmente clasifica la muestra como una muestra con SII con una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, y / o precisión global de al menos aproximadamente un 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%.

En algunos casos, los datos obtenidos al utilizar el sistema o sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje pueden procesarse utilizando un algoritmo de procesamiento. Tal algoritmo de procesamiento se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste de un perceptrón multicapa, red de retropropagación, y el algoritmo de Levenberg-Marquardt. En otros casos, puede utilizarse una combinación de tales algoritmos de procesamiento, en un modo paralelo o en serie.

Tal como se describió anteriormente, los métodos pueden comprender además el envío de los resultados de la clasificación del SII a un clínico, por ejemplo, un gastroenterólogo o un médico general. Los métodos también pueden proporcionar un diagnóstico en forma de una probabilidad de que el individuo tenga SII. Por ejemplo, el individuo puede tener alrededor de un 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o mayor probabilidad de tener SII. En algunos casos, los métodos proporcionan además un pronóstico del SII en el individuo. Por ejemplo, el pronóstico puede ser la cirugía, el desarrollo de una categoría o subtipo clínico de SII, el desarrollo de uno o más síntomas, o la recuperación de la enfermedad.

El diagnóstico de un individuo que tiene SII puede continuarse con la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco útil para el tratamiento de uno o más síntomas asociados con el SII. Medicamentos para el SII adecuados se han descrito anteriormente.

Los métodos pueden comprender además la clasificación de la muestra SII como muestra SII-A, SII-C, SII-D, SII-M, o SII-PI. En ciertos casos, la clasificación de la muestra SII en una categoría, la forma, o subtipo clínico del SII se basa en la presencia o nivel de al menos un marcador de clasificación. Los ejemplos no limitantes de marcadores de clasificación se describen a continuación. Preferiblemente, al menos una forma del SII se distingue de al menos otra forma del SII basándose en la presencia o el nivel de leptina. Los resultados de la clasificación pueden ser enviados a un clínico. En algunos casos, los métodos pueden proporcionar además un diagnóstico en forma de una probabilidad de que el individuo tenga SII-A, SII-C, SII-D, SII-M, o SII-PI. En otros casos, los métodos pueden comprender adicionalmente administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco útil para el tratamiento de SII-A, SII-C, SII-D, SII-M, o SII-PI tal como, por ejemplo, tegaserod (ZelnormTM), alosetrón (Lotronex[®]), lubiprostona (AmitizaTM), rifamixina (XifaxanTM), MD-1100, probióticos, y combinaciones de los mismos.

Los métodos pueden comprender, además el descarte de la inflamación intestinal. Los ejemplos no limitantes de inflamación intestinal se han descrito anteriormente. En ciertos casos, la inflamación intestinal se descarta basándose en la presencia o nivel de CRP, lactoferrina, y / o calprotectina.

En otro aspecto, se describe un método para el seguimiento de la progresión o regresión del SII en un individuo, comprendiendo el método:

(a) determinar un perfil de marcador de diagnóstico mediante la detección de la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra; y

(b) determinar la presencia o la gravedad del SII en el individuo utilizando un algoritmo basado en el perfil de marcador de diagnóstico.

En un aspecto relacionado, se describe un método para el seguimiento de la eficacia del fármaco en un individuo que recibe un fármaco útil para el tratamiento del SII, comprendiendo el método:

(a) determinar un perfil de marcador de diagnóstico mediante la detección de la presencia o nivel de al menos un diagnóstico marcador en la muestra; y

(b) determinar la eficacia del fármaco usando un algoritmo basado en el perfil de marcador de diagnóstico.

El perfil de marcador de diagnóstico se puede determinar mediante la detección de la presencia o nivel de al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, o más marcadores de diagnóstico seleccionado del grupo que consiste en una citoquinas (por ejemplo, IL-8, IL-1 β , TWEAK, leptina, OPG, MIP-3 β , GRO α , CXCL4/PF-4, y / o CXCL7/NAP-2), factor de crecimiento (por ejemplo, EGF, VEGF, PEDF, BDNF, y / o SDGF), anticuerpo anti-neutrófilos (por ejemplo, ANCA, pANCA, cANCA, NSNA, y / o SAPPa), ASCA (por ejemplo, ASCA-IgA, ASCA-IgG, y / o ASCA-IgM), anticuerpo antimicrobiano (por ejemplo, anticuerpo anti-OmpC, anticuerpo anti-flagelina, y / o anticuerpo anti-I2), lactoferrina, anticuerpo anti-tTG, lipocalina (por ejemplo, NGAL, complejo NGAL/MMP-9), MMP (por ejemplo, MMP-9), TIMP (por ejemplo, TIMP-1), alfa-globulina (por ejemplo, alfa-2-macroglobulina, haptoglobina, y / o orosomucoide), proteína fragmentadora de actina (por ejemplo, gelsolina), proteína S100 (por ejemplo, calgranulina), fibrinopéptido (por ejemplo, FIBA), CGRP, taquiquininas (por ejemplo, sustancia P), grelina, neurotensina, hormona liberadora de corticotropina, y combinaciones de los mismos. También se pueden determinar la presencia o el nivel de otros marcadores de diagnóstico tales como, por ejemplo, el anticuerpo anti-lactoferrina, L-selectina / CD62L, elastasa, proteína C-reactiva (CRP), calprotectina, autoanticuerpo anti-U1 de 70 kDa, zona occludens 1 (ZO-1), péptido vasoactivo intestinal (VIP), suero amiloide A, y / o gastrina.

La muestra utilizada para detectar o determinar la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico es normalmente sangre entera, plasma, suero, saliva, orina, deposiciones (es decir, heces), lágrimas, y cualquier otro fluido corporal, o una muestra de tejido (es decir, biopsia) tal como una muestra de intestino delgado o de colon. Preferiblemente, la muestra es suero, sangre completa, plasma, heces, orina, o una biopsia de tejido. En ciertos casos, los métodos pueden comprender además la obtención de la muestra del individuo antes de detectar o determinar la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra.

Puede construirse y utilizarse un panel para la medición de uno o más de los marcadores de diagnóstico descritos anteriormente para determinar la presencia o la gravedad del SII o para determinar la eficacia de un fármaco para el SII. Un experto en la técnica apreciará que la presencia o el nivel de una pluralidad de marcadores de diagnóstico se pueden determinar simultáneamente o secuencialmente, usando, por ejemplo, una alícuota o dilución de la muestra del individuo. Como se describió anteriormente, el nivel de un marcador de diagnóstico en particular en la muestra del individuo se considera generalmente elevado cuando es al menos aproximadamente un 25%, 50%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, o 1000% mayor que el nivel del mismo marcador en una muestra comparativa o población de muestras (por ejemplo, mayor que un nivel medio). Del mismo modo, el nivel de un marcador diagnóstico en particular en la muestra del individuo se considera normalmente bajo cuando es al menos aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% inferior al nivel del mismo marcador en una muestra comparativa o de la población de muestras (por ejemplo, inferior al nivel medio).

En ciertos casos, la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico se determina usando un ensayo tal como un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. Ejemplos de ensayos de hibridación y ensayos basados en la amplificación adecuados para utilizar en los métodos se han descrito anteriormente. Alternativamente, la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico se determina usando un inmunoensayo o un ensayo inmunohistoquímico. Se han descrito anteriormente ejemplos no limitantes de inmunoensayos y ensayos inmunohistoquímicos adecuados para utilizar en los métodos.

El método de control de la progresión o regresión del SII puede comprender la determinación de un perfil de marcador de diagnóstico, opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas, en el que el perfil de síntomas se determina mediante la identificación de la presencia o la gravedad de al menos un síntoma en el individuo; y determinar la presencia o la gravedad del SII en el individuo utilizando un algoritmo basado en el perfil de marcador de diagnóstico y el perfil de los síntomas. El método para monitorizar la eficacia del fármaco para el SII también puede comprender determinar un perfil de marcador de diagnóstico, opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas, en el que el perfil de síntomas se determina mediante la identificación de la presencia o la gravedad de al menos un síntoma en el individuo; y la determinación de la eficacia del fármaco usando un algoritmo basado en el perfil de marcador de diagnóstico y el perfil de los síntomas. Un experto en la técnica apreciará que el perfil de marcador de diagnóstico y el perfil de los síntomas se pueden determinar simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden.

La determinación de la presencia o la gravedad del SII o la eficacia de un fármaco para el SII puede basarse en el perfil de marcador de diagnóstico, solo o en combinación con un perfil de síntomas, junto con un algoritmo estadístico. En ciertos casos, el algoritmo estadístico es un sistema clasificador estadístico de aprendizaje. El sistema clasificador estadístico de aprendizaje comprende cualquiera de los sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje descritos anteriormente.

En ciertos casos, el algoritmo estadístico es un sistema clasificador estadístico de aprendizaje único. Preferiblemente, el sistema clasificador estadístico de aprendizaje único es un algoritmo estadístico basado en árboles (por ejemplo, RF, C&RT, etc.). En otros casos, el algoritmo estadístico es una combinación de al menos

dos sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje. Preferiblemente, la combinación de sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje comprenden un RF y NN (por ejemplo, NN artificial, etc.), por ejemplo, se utiliza en tándem o en paralelo. Como un ejemplo no limitativo, una primera RF puede utilizarse para generar un valor de predicción o probabilidad basado en el perfil de marcador de diagnóstico, solo o en combinación con un perfil de síntomas, y a continuación, se puede utilizar un NN para determinar la presencia o la gravedad del SII en el individuo o la eficacia del fármaco para el SII basado en la predicción o valor de probabilidad y el mismo o diferente perfil de marcador de diagnóstico o combinación de perfiles.

En algunos casos, los datos obtenidos para utilizar el sistema o sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje pueden procesarse utilizando un algoritmo de procesamiento. Dicho algoritmo de procesamiento se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste de un perceptrón multicapa, red de retropropagación, y el algoritmo de Levenberg-Marquardt. En otros casos, una combinación de tales algoritmos de procesamiento puede utilizarse, en un modo paralelo o en serie.

Se describe que los métodos pueden comprender además la comparación de la presencia o la gravedad del SII en el individuo determinado en el paso (b) con la presencia o gravedad del SII en el individuo en un momento anterior. Como un ejemplo no limitativo, la presencia o la gravedad del SII determinados para un individuo que recibe un fármaco para el SII puede ser comparado con la presencia o la gravedad del SII determinado para el mismo individuo antes del inicio del uso del fármaco para el SII o en un momento anterior en terapia. Los métodos también pueden comprender la determinación de la eficacia del fármaco para el SII mediante la comparación de la eficacia del fármaco para el SII determinada en el paso (b) a la eficacia del fármaco para el SII en el individuo en un momento anterior en la terapia. Los métodos pueden comprender, además, el envío de los resultados de monitorización del SII a un médico, por ejemplo, un gastroenterólogo o un médico general.

En un aspecto adicional, un medio legible por ordenador se describe para incluir código para controlar uno o más procesadores para clasificar si una muestra de un individuo se asocia con SII, el código comprende:

instrucciones para aplicar un proceso estadístico de datos a un grupo de datos que comprende un perfil de marcador de diagnóstico para producir una decisión derivada estadísticamente para la clasificación de la muestra como una muestra con SII o muestra sin SII con base en el perfil de marcador de diagnóstico,

en el que el perfil de marcador de diagnóstico indica la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra.

El perfil de marcador de diagnóstico puede indicar la presencia o nivel de al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, o más marcadores diagnósticos seleccionados del grupo que consiste de una citoquina (por ejemplo, IL-8, IL-1 β , TWEAK, leptina, OPG, MIP-3 β , GRO, CXCL4/PF-4, y / o CXCL7/NAP-2), factor de crecimiento (por ejemplo, EGF, VEGF, PEDF, BDNF, y / o SDGF), anticuerpo anti-neutrófilos (por ejemplo, ANCA, pANCA, cANCA, NSNA, y / o SAPPa), ASCA (por ejemplo, ASCA-IgA, ASCA-IgG, y / o ASCA-IgM), anticuerpo antimicrobiano (por ejemplo, anticuerpo anti-OmpC, anticuerpo anti-flagelina, y / o anticuerpo anti-I2), lactoferrina, anticuerpo anti-tTG, lipocalina (por ejemplo, NGAL, complejo NGAL/MMP-9), MMP (por ejemplo, MMP-9), TIMP (por ejemplo, TIMP-1), alfa-globulina (por ejemplo, alfa-2-macroglobulina, haptoglobina, y / o orosomucoide), proteína fragmentadora de actina (por ejemplo, gelsolina), proteína S100 (por ejemplo, calgranulina), fibrinopéptido (por ejemplo, FIBA), CGRP, taquiquininas (por ejemplo, sustancia P), grelina, neurotensina, hormona liberadora de corticotropina, y combinaciones de los mismos. La presencia o el nivel de otros marcadores de diagnóstico tales como, por ejemplo, el anticuerpo anti-lactoferrina, L-selectina/CD62L, elastasa, proteína C-reactiva (CRP), calprotectina, autoanticuerpo anti-U1 de 70 kDa, zona occludens 1 (ZO-1), péptido vasoactivo intestinal (VIP), suero amiloide A, y / o gastrina también pueden ser indicativos del perfil de marcador de diagnóstico.

El medio legible por ordenador para confirmar el SII puede comprender instrucciones para aplicar un proceso estadístico a un conjunto de datos que comprende un perfil de marcador de diagnóstico, opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas que indica la presencia o la gravedad de al menos un síntoma en el individuo para producir una decisión derivada estadísticamente que clasifica la muestra como una muestra con SII o muestra sin SII con base en el perfil de marcador de diagnóstico y el perfil de los síntomas. Un experto en la técnica apreciará que el proceso estadístico puede ser aplicado al perfil de marcador de diagnóstico y el perfil de los síntomas de forma simultánea o secuencialmente en cualquier orden.

El proceso estadístico puede ser un sistema clasificador estadístico de aprendizaje. Ejemplos de sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje adecuados para su uso en el método descrito se han descrito anteriormente. En ciertos casos, el proceso estadístico es un sistema clasificador estadístico de aprendizaje único, tal como, por ejemplo, un RF o C&RT. En otros casos, el proceso estadístico es una combinación de al menos dos sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje. Como un ejemplo no limitativo, la combinación de sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje comprende un RF y un NN, por ejemplo, que se utilizan en tándem. En algunos casos, los datos obtenidos de usar el sistema o sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje pueden procesarse utilizando un algoritmo de procesamiento.

En un aspecto relacionado, un medio legible por ordenador se describe incluyendo el código para controlar uno o más procesadores para clasificar si una muestra de un individuo se asocia con SII, el código comprende:

(a) instrucciones para aplicar un primer proceso estadístico a un conjunto de datos que comprende un perfil de marcador de diagnóstico para producir una decisión derivada estadísticamente que clasifica la muestra como una muestra con EII o muestra sin EII basado en el perfil de marcador de diagnóstico, en el que el perfil de marcador de diagnóstico indica la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra; y si la muestra se clasifica como una muestra sin EII,

(b) instrucciones para aplicar un segundo proceso estadístico al mismo grupo de datos o a uno diferente para producir una segunda decisión derivada estadísticamente que clasifica la muestra sin EII como una muestra con SII o una muestra sin SII.

El perfil de marcador de diagnóstico puede indicar la presencia o nivel de al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, o más marcadores diagnósticos seleccionados del grupo que consiste de una citoquina (por ejemplo, IL-8, IL-1 β , TWEAK, leptina, OPG, MIP-3 β , GRO α , CXCL4/PF-4, y / o CXCL7/NAP-2), factor de crecimiento (por ejemplo, EGF, VEGF, PEDF, BDNF, y / o SDGF), anticuerpo anti-neutrófilos (por ejemplo, ANCA, pANCA, cANCA, NSNA, y / o SAPPa), ASCA (por ejemplo, ASCA-IgA, ASCA-IgG, y / o ASCA-IgM), anticuerpo antimicrobiano (por ejemplo, anticuerpo anti-OmpC, anticuerpo anti-flagelina, y / o anticuerpo anti-I2), lactoferrina, anticuerpo anti-tTG, lipocalina (por ejemplo, NGAL, complejo NGAL/MMP-9), MMP (por ejemplo, MMP-9), TIMP (por ejemplo, TIMP-1), alfa-globulina (por ejemplo, alfa-2-macroglobulina, haptoglobina, y / o orosomucoide), proteína fragmentadora de actina (por ejemplo, gelsolina), proteína S100 (por ejemplo, calgranulina), fibrinopéptido (por ejemplo, FIBA), CGRP, taquiquininas (por ejemplo, sustancia P), grelina, neurotensina, hormona liberadora de corticotropina, y combinaciones de los mismos. La presencia o el nivel de otros marcadores de diagnóstico tales como, por ejemplo, el anticuerpo anti-lactoferrina, L-selectina/CD62L, elastasa, proteína C-reactiva (CRP), calprotectina, autoanticuerpo anti-U1 de 70 kDa, zona occludens 1 (ZO-1), péptido vasoactivo intestinal (VIP), suero amiloide A, y / o gastrina también pueden ser indicativos del perfil de marcador de diagnóstico.

El medio legible por ordenador para descartar primero la EII y que confirmar después el SII puede comprender instrucciones para aplicar un primer proceso estadístico a un conjunto de datos que comprende un perfil marcador diagnóstico opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas que indica la presencia o la gravedad de al menos uno de los síntomas en el individuo para producir una decisión derivada estadísticamente que clasifica la muestra como una muestra con EII o muestra sin EII basado en el perfil de marcador de diagnóstico y el perfil de los síntomas; y si la muestra se clasifica como una muestra sin EII, instrucciones para aplicar un segundo proceso estadístico al mismo grupo de datos o a uno diferente para producir una segunda decisión derivada estadísticamente que clasifica la muestra sin EII como una muestra con SII o muestra sin SII. Un experto en la técnica apreciará que el primer y / o segundo proceso estadístico puede ser aplicado al perfil de marcador de diagnóstico y el perfil de los síntomas de forma simultánea o secuencialmente en cualquier orden.

El primer y segundo proceso estadístico pueden aplicarse en diferentes procesadores. Alternativamente, el primer y segundo proceso estadístico se aplican en un único procesador. El primer proceso estadístico puede ser un sistema clasificador estadístico de aprendizaje. Ejemplos de sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje adecuados para su uso en el método descrito se han descrito anteriormente. En ciertos casos, el primer y / o segundo proceso estadístico es un sistema clasificador estadístico aprendizaje único, tal como, por ejemplo, un RF o C&RT. En otros casos, el primer y / o segundo proceso estadístico es una combinación de al menos dos sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje. Como un ejemplo no limitativo, la combinación de sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje comprenden un RF y un NN o SVM, por ejemplo, que se utilizan en tándem. En algunos casos, los datos obtenidos de usar el sistema o sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje pueden procesarse utilizando un algoritmo de procesamiento.

En un aspecto adicional, se describe un sistema para clasificar si una muestra de un individuo se asocia con SII, el sistema comprende:

(a) un módulo de adquisición de datos configurado para producir un conjunto de datos que comprende un perfil de marcador de diagnóstico, en el que el perfil marcador de diagnóstico indica la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra;

(b) un módulo de procesamiento de datos configurado para procesar el conjunto de datos mediante la aplicación de un proceso estadístico para el conjunto de datos para producir una decisión derivada estadísticamente que clasifica la muestra como una muestra con SII o muestra sin SII con base en el perfil de marcador de diagnóstico; y

(c) un módulo de pantalla configurada para mostrar la decisión derivada estadísticamente.

El perfil de marcador de diagnóstico puede indicar la presencia o nivel de al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, o más marcadores diagnósticos seleccionados del grupo que consiste de una citoquina (por ejemplo, IL-8, IL-1 β , TWEAK, leptina, OPG, MIP-3 β , GRO α , CXCL4/PF-4, y / o CXCL7/NAP-2), factor de crecimiento (por ejemplo, EGF, VEGF, PEDF, BDNF, y / o SDGF), anticuerpo anti-neutrófilos (por ejemplo, ANCA, pANCA, cANCA, NSNA, y / o SAPPa), ASCA (por ejemplo, ASCA-IgA, ASCA-IgG, y / o ASCA-IgM), anticuerpo antimicrobiano (por ejemplo, anticuerpo anti-OmpC, anticuerpo anti-flagelina, y / o anticuerpo anti-I2), lactoferrina, anticuerpo anti-tTG, lipocalina (por ejemplo, NGAL, complejo NGAL/MMP-9), MMP (por ejemplo, MMP-9), TIMP (por ejemplo, TIMP-1), alfa-globulina (por ejemplo, alfa-2-macroglobulina, haptoglobina, y / o orosomucoide), proteína fragmentadora de actina (por ejemplo, gelsolina), proteína S100 (por ejemplo, calgranulina), fibrinopéptido (por ejemplo, FIBA), CGRP, taquiquininas (por ejemplo, sustancia P), grelina, neurotensina, hormona liberadora de corticotropina, y combinaciones de los mismos. La presencia o el nivel de otros marcadores de diagnóstico tales como, por ejemplo, el anticuerpo anti-lactoferrina, L-selectina / CD62L, elastasa, proteína C-reactiva (CRP), calprotectina, autoanticuerpo anti-U1 de 70 kDa, zona occludens 1 (ZO -1), péptido vasoactivo intestinal (VIP), suero amiloide A, y / o gastrina también pueden ser indicativos del perfil de marcador de diagnóstico.

El sistema para confirmar el SII puede comprender un módulo de adquisición de datos configurado para producir un conjunto de datos que comprende un perfil de marcador de diagnóstico, opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas que indica la presencia o la gravedad de al menos un síntoma en el individuo; un módulo de procesamiento de datos configurado para procesar el conjunto de datos mediante la aplicación de un proceso estadístico para el conjunto de datos para producir una decisión derivada estadísticamente que clasifica la muestra como una muestra con SII o muestra sin SII con base en el perfil de marcador de diagnóstico y el perfil de los síntomas; y un módulo de pantalla configurada para mostrar la decisión obtenida por estadística.

El proceso estadístico puede ser un sistema clasificador estadístico de aprendizaje. Ejemplos de sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje adecuados para su uso en el método descrito se han descrito anteriormente. En ciertos casos, el proceso estadístico es un sistema clasificador estadístico de aprendizaje único, tal como, por ejemplo, un RF o C&RT. En otros casos, el proceso estadístico es una combinación de al menos dos sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje, por ejemplo, utilizados en tándem o en paralelo. Los datos obtenidos de usar el sistema o sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje pueden procesarse utilizando un algoritmo de procesamiento.

En un aspecto relacionado, se describe un sistema para la clasificación de si una muestra de un individuo se asocia con SII, el sistema comprende:

- (a) un módulo de adquisición de datos configurado para producir un conjunto de datos que comprende un perfil de marcador de diagnóstico, en el que el perfil marcador de diagnóstico indica la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra;
- (b) un módulo de procesamiento de datos configurado para procesar el conjunto de datos mediante la aplicación de un primer proceso estadístico para el conjunto de datos para producir una primera decisión derivada estadísticamente que clasifica la muestra como una muestra con EII o muestra sin EII basado en el perfil de marcador de diagnóstico; Si la muestra se clasifica como una muestra sin EII, un módulo de procesamiento de datos configurado para aplicar un segundo proceso estadístico para establecer para producir una segunda decisión derivada estadísticamente que clasifica la muestra sin EII como una muestra del SII o no los mismos o diferentes de datos muestra SII; y
- (c) un módulo de pantalla configurada para mostrar la primera y / o la segunda decisión derivada estadísticamente.

El perfil de marcador de diagnóstico pueden indicar la presencia o nivel de al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, o más diagnósticos marcadores seleccionados del grupo que consiste de una citoquina (por ejemplo, , IL-8, IL-1 β , TWEAK, la leptina, OPG, MIP-3 β , GRO α , CXCL4/PF-4, y / o CXCL7/NAP-2), factor de crecimiento (por ejemplo, EGF, VEGF, PEDF, BDNF, y / o SDGF), anticuerpo anti-neutrófilos (por ejemplo, ANCA, pANCA, cANCA, NSNA, y / o SAPPa), ASCA (por ejemplo, ASCA-IgA, ASCA-IgG, y / o ASCA-IgM), anticuerpo antimicrobiano (por ejemplo, anticuerpo anti-OmpC, el anticuerpo anti-flagelina, y / o anticuerpo anti-I2), lactoferrina, anticuerpo anti-tTG, lipocalina (por ejemplo, NGAL, complejo NGAL/MMP-9), MMP (por ejemplo, MMP-9), TIMP (por ejemplo, TIMP-1), alfa-globulina (por ejemplo, alfa-2-macroglobulina, haptoglobina, y / o orosomucoide), proteína fragmentadora de actina (por ejemplo, gelsolina), proteína S100 (por ejemplo, calgranulina), fibrinopéptido (por ejemplo, FIBA), CGRP, taquiquininas (por ejemplo, sustancia P), grelina, neurotensina, hormona liberadora de corticotropina, y combinaciones de los mismos. La presencia o el nivel de otros marcadores de diagnóstico tales como, por ejemplo, el anticuerpo anti-lactoferrina, L-selectina / CD62L, elastasa, proteína C-reactiva (CRP), calprotectina, autoanticuerpo anti-U1 de 70 kDa, zona occludens 1 (ZO -1), péptido vasoactivo intestinal (VIP), suero amiloide A, y / o gastrina también pueden ser indicativos del perfil de marcador de diagnóstico.

El sistema para descartar primero la EII y luego confirmar el SII puede comprender un módulo de adquisición de datos configurado para producir un conjunto de datos que comprende un perfil de marcador de diagnóstico, opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas que indica la presencia o la gravedad de al menos un síntoma en el individuo; un módulo de procesamiento de datos configurado para procesar el conjunto de datos mediante la aplicación de un primer proceso estadístico para el conjunto de datos para producir una primera decisión derivada estadísticamente que clasifica la muestra como una muestra con EII o muestra sin EII basado en el perfil de marcador de diagnóstico y el perfil de los síntomas; Si la muestra se clasifica como una muestra sin EII, un módulo de procesamiento de datos configurado para aplicar un segundo proceso estadístico los al mismo grupo de datos o a uno diferente para producir una segunda decisión derivada estadísticamente que clasifica la muestra sin EII como una muestra con SII o sin SII; y un módulo de pantalla configurada para mostrar la primera y / o segunda decisión obtenida por estadística.

El primer y / o segundo proceso estadístico puede ser un sistema clasificador estadístico de aprendizaje. Ejemplos de sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje adecuados para su uso en el método descrito se han descrito anteriormente. En ciertos casos, el primer y / o segundo proceso estadístico es un sistema clasificador estadístico aprendizaje único, tales como, por ejemplo, un RF o C&RT. En otros casos, el primer y / o segundo proceso estadístico es una combinación de al menos dos sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje, por ejemplo, utilizados en tándem o en paralelo. En algunos casos, los datos obtenidos de usar el sistema o sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje pueden procesarse utilizando un algoritmo de procesamiento. El primer y segundo proceso estadístico puede aplicarse a diferentes procesadores. Alternativamente, el primer y segundo proceso estadístico se aplica a un único procesador.

IV. Enfermedades y trastornos con síntomas parecidos al SII

Una variedad de enfermedades y trastornos estructurales o metabólicos puede causar signos o síntomas que son similares a SII. Como ejemplos no limitantes, los pacientes con enfermedades y trastornos tales como la enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad celíaca (EC), inflamación aguda, diverticulitis, anastomosis ileal-bolsa anal, colitis microscópica, diarrea infecciosa crónica, deficiencia de lactasa, cáncer (por ejemplo, cáncer colorrectal), una obstrucción mecánica del intestino delgado o el colon, una infección intestinal, isquemia, mala digestión, malabsorción, la endometriosis y trastornos inflamatorios no identificados del tracto intestinal pueden presentarse con dolor abdominal asociado con dolor leve a moderado y un cambio en la consistencia y / o la frecuencia de las heces que son similares al SII. Otros síntomas adicionales similares a SII pueden incluir diarrea crónica o estreñimiento o una forma alterna de cada uno, la pérdida de peso, distensión abdominal o hinchazón, y moco en las heces.

La mayoría de pacientes con EII se pueden clasificar en uno de los dos subtipos clínicos distintos, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria que afecta a la parte inferior del íleon y, a menudo implica el colon y otras regiones del tracto intestinal. La colitis ulcerosa se caracteriza por una inflamación localizada principalmente en la mucosa y submucosa del intestino grueso. Los pacientes que sufren de estos subtipos clínicos de EII tienen normalmente síntomas similares al SII tales como, por ejemplo, dolor abdominal, diarrea crónica, pérdida de peso, y calambres.

La presentación clínica de la enfermedad celíaca también se caracteriza por síntomas similares al SII por ejemplo, malestar abdominal asociado con diarrea crónica, pérdida de peso y distensión abdominal. La enfermedad celíaca es un trastorno inmunomediado de la mucosa intestinal que normalmente se asocia con atrofia de las vellosidades, hiperplasia de las criptas, y / o inflamación del revestimiento de la mucosa del intestino delgado. Además de la mala absorción de los nutrientes, las personas con enfermedad celíaca corren el riesgo de deficiencia de minerales, deficiencia de vitaminas, osteoporosis, enfermedades autoinmunes y neoplasias intestinales (por ejemplo, linfoma y carcinoma). Se cree que la exposición a proteínas tales como gluten (por ejemplo, las proteínas de glutenina y de prolamina que están presentes en el trigo, centeno, cebada, avena, mijo, triticale, espelta, y kamut), en el contexto genético y ambiental apropiado, es responsable de causar la enfermedad celíaca.

Otras enfermedades y trastornos caracterizados por inflamación intestinal que se presentan con síntomas similares al SII son, por ejemplo, inflamación aguda, diverticulitis, anastomosis ileal-bolsa anal, colitis microscópica, y diarrea infecciosa crónica, así como los trastornos inflamatorios no identificados del tracto intestinal. Los pacientes que experimentan episodios de inflamación aguda generalmente tienen niveles elevados de proteína C reactiva (PCR), además de los síntomas similares al SII. La PCR es producida por el hígado durante la fase aguda del proceso inflamatorio y se libera generalmente cerca de 24 horas tras el inicio del proceso inflamatorio. Los pacientes que sufren de diverticulitis, anastomosis ileal-bolsa anal, colitis microscópica, y diarrea infecciosa crónica tienen normalmente niveles de lactoferrina y / o calprotectina fecal elevados además de los síntomas similares al SII. La lactoferrina es una glicoproteína secretada por las membranas mucosas y es la principal proteína en los gránulos secundarios de leucocitos. Los leucocitos son comúnmente reclutados en sitios inflamatorios en los que se activan, liberando el contenido de gránulos a la zona circundante. Este proceso aumenta la concentración de lactoferrina en las heces.

Los niveles altos de lactoferrina se observan en pacientes con anastomosis entre la bolsa ileoanal (es decir, una bolsa se crea después de la resección completa del colon en los casos graves de la enfermedad de Crohn), en comparación con otras condiciones no inflamatorias de la bolsa, como síndrome de bolsa irritable. Los niveles elevados de lactoferrina también se observan en pacientes con diverticulitis, una enfermedad en la que bolsas abultadas (es decir, los divertículos) en el tracto digestivo se inflaman y / o infectan, causando dolor abdominal severo, fiebre, náuseas y un marcado cambio en los hábitos intestinales. La colitis microscópica es un trastorno inflamatorio crónico que también se asocia con un aumento de los niveles de lactoferrina fecal. La colitis microscópica se caracteriza por diarrea acuosa persistente (sin sangre), dolor abdominal por lo general asociados con la pérdida de peso, una mucosa normal durante el examen colonoscópico y radiológico, y cambios histopatológicos muy específicos. La colitis microscópica consta de dos enfermedades, colitis colagenosa y la colitis linfocítica. La colitis colagenosa es de etiología desconocida y se encuentra en pacientes con diarrea acuosa a largo plazo y un examen colonoscópico normal. Tanto la colitis colagenosa y la colitis linfocítica se caracterizan por aumento de los linfocitos en el revestimiento del colon. La colitis colagenosa se caracteriza además por un engrosamiento de la capa de colágeno subepitelial del colon. La diarrea infecciosa crónica es una enfermedad que también se asocia con un aumento de los niveles de lactoferrina fecal. La diarrea infecciosa crónica suele ser causada por una infección bacteriana, viral o por protozoos, con pacientes que presentan síntomas similares al SII, como la diarrea y el dolor abdominal. Los niveles elevados de lactoferrina también se observan en pacientes con EII.

Además de la determinación de los niveles de PCR y / o lactoferrina y / o de calprotectina, también se pueden descartar enfermedades y trastornos asociados con la inflamación intestinal mediante la detección de la presencia de sangre en las heces, tales como hemoglobina fecal. El sangrado intestinal que se produce sin que el conocimiento del paciente se denomina hemorragia oculta o escondida. La presencia de hemorragia oculta (por ejemplo, la hemoglobina fecal) se observa normalmente en una muestra de heces del paciente. Otras condiciones tales como las úlceras (por ejemplo, gástrica, duodenal), cáncer (por ejemplo, cáncer de estómago, cáncer colorrectal), y las hemorroides pueden también presentar síntomas similares al SII incluyendo dolor abdominal y un cambio en la consistencia y / o la frecuencia de las heces.

Además, también pueden analizarse los niveles de calprotectina fecal. La calprotectina es una proteína de unión de calcio con actividad antimicrobiana que deriva predominantemente de neutrófilos y monocitos. La calprotectina se ha encontrado por tener relevancia clínica en la fibrosis quística, la artritis reumatoide, la EII, el cáncer colorrectal, el VIH y otras enfermedades inflamatorias. Su nivel se ha medido en suero, plasma, oral, líquido cefalorraquídeo y sinovial, orina y heces. Han sido reconocidas las ventajas de calprotectina fecal en los trastornos gastrointestinales: es estable durante 3-7 días a temperatura ambiente que permiten el envío de muestras a través de correo ordinario; está correlacionada con alfa 1-antitripsina fecal en pacientes con enfermedad de Crohn; y en niveles elevados en una gran mayoría de pacientes con carcinomas gastrointestinales y EII. Se encontró que la calprotectina fecal se correlaciona bien con clasificaciones endoscópicas e histológicas de actividad de la enfermedad en la colitis ulcerosa, y con la excreción fecal de granulocitos neutrófilos marcados con iridio-111, que es un estándar de actividad de la enfermedad en la EII.

En vista de lo anterior, es evidente que una amplia gama de enfermedades y trastornos puede causar síntomas similares al SII, creando así un obstáculo sustancial para la clasificación definitiva de una muestra como una muestra con SII. Sin embargo, el método descrito supera esta limitación mediante la clasificación de una muestra de un individuo como una muestra con SII usando, por ejemplo, un algoritmo estadístico, o mediante la exclusión de (es decir, descartando) las enfermedades y trastornos que comparten una presentación clínica similar al SII e identificar (es decir, confirmar) el SII en una muestra usando, por ejemplo, una combinación de algoritmos estadísticos.

V. Marcadores de diagnóstico

Una variedad de marcadores de diagnóstico son adecuados para su uso en los métodos, sistemas, y el código de clasificación de una muestra de un individuo como una muestra con SII o para descartar una o más enfermedades o trastornos asociados con síntomas similares al SII en una muestra de un individuo. Ejemplos de marcadores de diagnóstico incluyen, sin limitación, citoquinas, factores de crecimiento, anticuerpos anti-neutrófilos, anticuerpos anti-Saccharomyces cerevisiae, anticuerpos antimicrobianos, anticuerpos anti-transglutaminasa tisular (tTG), lipocalinas, metaloproteinasas de la matriz (MMP), complejos de lipocalina y MMP, tejido inhibidor de metaloproteinasas (TIMP), globulinas (por ejemplo, alfa-globulinas), proteínas fragmentadas de actina, proteínas S100, fibrinopéptidos, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), taquiquininas, grelina, neurotensina, hormona liberadora de corticotropina (CRH), elastasa, proteína C-reactiva (CRP), lactoferrina, anticuerpos anti-lactoferrina, calprotectina, hemoglobina, NOD2/CARD15, transportador de la recaptación de serotonina (SERT), triptófano hidroxilasa-1, 5-hidroxitriptamina (5-HT), lactulosa, y combinaciones de los mismos. Se pueden seleccionar marcadores de diagnóstico adicionales para la predicción del SII utilizando las técnicas descritas en el Ejemplo 14. Un experto en la técnica también conocerá otros marcadores de diagnóstico adecuados para su uso en el método descrito.

A. Citoquinas

La determinación de la presencia o nivel de al menos una citoquina en una muestra es particularmente útil en el método descrito. Tal como se utiliza aquí, el término "citoquina" incluye cualquiera de una variedad de polipéptidos o proteínas secretadas por las células inmunes que regulan una variedad de funciones del sistema inmune y abarca pequeñas citoquinas tales como quimiocinas. El término "citoquina" también incluye adipocitoquinas, que comprenden un grupo de citoquinas secretadas por los adipocitos que funcionan, por ejemplo, en la regulación del peso corporal, la hematopoyesis, angiogénesis, cicatrización de heridas, resistencia a la insulina, la respuesta inmune y la respuesta inflamatoria.

En ciertos aspectos, se determina en una muestra la presencia o nivel de al menos una citoquina, incluyendo, pero no limitado a, TNF- α , inductor de apoptosis débil relacionado con TNF (TWEAK), osteoprotegerina (OPG), IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , antagonista del receptor IL-1 (IL-1ra), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, receptor soluble de IL-6 (sIL-6R), IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-23 e IL-27. En otros aspectos, se determina en una muestra la presencia o nivel de al menos una quimiocina tal como, por ejemplo, CXCL1/GRO1/GRO, CXCL2/GRO2, CXCL3/GRO3, CXCL4/PF-4, CXCL5/ENA-78, CXCL6/GCP-2, CXCL7/NAP-2, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC, CXCL12/SDF-1, CXCL13/BCA-1, CXCL14BRAK, CXCL15, CXCL16, CXCL17/DMC, CCL1, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL6/C10, CCL7/MCP-3, CCL8/MCP-2, CCL9/CCL10, CCL11/eotaxina, CCL12/MCP-5, CCL13/MCP-4, CCL14/HCC-1, CCL15/MIP-5, CCL16/LEC, CCL17/TARC, CCL18/MIP-4, CCL19/MIP-3 β , CCL20/MIP-3 α , CCL21/SLC, CCL22/MDC, CCL23/MP1F1, CCL24/eotaxina-2, CCL25/TECK, CCL26/eotaxina-3, CCL27/CTACK, CCL28/MEC, CL1, CL2, y CX3CL1. En ciertos aspectos adicionales, la presencia o nivel de al menos una adipocitoquina incluyendo, pero sin limitarse a, leptina, adiponectina, resistina, inhibidor del activador de plasminógeno activo o total 1 (PAI-1), visfatina, y proteína de unión de retinol 4 (RBP4) se determina en una muestra. Preferiblemente, se determina la presencia o el nivel de IL-8, IL-10, TWEK, leptina, OPG, MIP-3 β , GRO α , CXCL4/PF-4, y/o CXCL7/NAP-2.

En ciertos casos, se detecta la presencia o el nivel de una citoquina particular a nivel de la expresión de RNAm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En otros casos, se detecta la presencia o el nivel de una citoquina particular, a nivel de expresión de proteína utilizando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Equipos de ELISA adecuados para determinar la presencia o el nivel de una citoquina tal como IL-8, IL-1 β , MIP-3 β , GRO α , CXCL4/PF-4, o CXCL7/NAP-2 en un suero, plasma, saliva, o muestra de orina están disponibles en, por ejemplo, R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN), Neogen Corp. (Lexington, KY), Alpco Diagnostics (Salem, NH), Assay designs, Inc. (Ann Arbor, MI), BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA), Invitrogen (Camarillo, CA), Calbiochem (San Diego, CA), Chemicon International, Inc. (Temecula, CA), Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY), QIAGEN Inc. (Valencia, CA), Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA), y/o Bender MedSystems Inc. (Burlingame, CA).

1. TWEAK

TWEAK es un miembro de la superfamilia de TNF estructuralmente relacionadas con las citoquinas. El TWEAK de longitud completa, anclado a la membrana se puede encontrar en la superficie de muchos tipos de células y también se ha detectado en el medio extracelular una forma más pequeña, biológicamente activa, generada a través de procesamiento proteolítico, (véase, por ejemplo, Chicheportiche et al., J. Biol. Chem., 272: 32401-32410 (1997)). TWEAK actúa a través de la unión a un miembro de la superfamilia de receptores de TNF llamado factor de crecimiento de fibroblastos inducible 14 (Fn14, también conocido como miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral 12A o TNFRSF12A). TWEAK tiene múltiples actividades biológicas, incluyendo la estimulación del crecimiento celular y la angiogénesis, la inducción de citoquinas inflamatorias, y la estimulación de la apoptosis (véase, por ejemplo, Wiley et al., Cytokine Growth Factor Rev., 14: 241-249 (2003)). En particular, TWEAK se ha demostrado que induce la expresión de PGE2, MMP-1, IL-6, IL-8, RANTES, e IP-10 en los fibroblastos y sinoviocitos, y para sobreregular la expresión de ICAM-1, E-selectina, IL-8 y MCP-1 en las células endoteliales (véase, por ejemplo, Campbell et al., Front. Biosci., 9: 2273-2284 (2004)). También se ha demostrado que TWEAK unido al receptor Fn14, o la sobreexpresión constitutiva de Fn14, activa la vía de señalización de NF- κ B, que desempeña un papel importante en los procesos inmunes e inflamatorios, la oncogénesis, la resistencia a la terapia del cáncer, y la tumorigénesis (véase, por ejemplo, Winkles et al., Cancer Lett, 235: 11-17 (2006); y Winkles et al., Front. Biosci., 12: 2761-2771 (2007)). Un experto en la técnica apreciará que TWEAK también se conoce como miembro de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral 12A (TNFSF12), ligando APO3 (APO3L), CD255, ligando DR3, FN14 y UNQ181/PRO207.

Los equipos de ELISA adecuados para determinar la presencia o nivel de TWEAK en una muestra biológica tal como suero, plasma, saliva o muestra de orina están disponibles de, por ejemplo, Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY), Bender MedSystems Inc. (Burlingame, CA), Agdia Inc. (Elkhart, IN), American Investigation Products Inc. (Belmont, MA), Biomedica Corp. (Foster City, CA), BioVision, Inc. (Mountain View, CA), y Kamiya Biomedical Co. (Seattle, WA).

2. Osteoprotegerina (OPG)

OPG es un miembro de 401 aminoácidos de la superfamilia de TNF de citoquinas estructuralmente relacionadas. OPG, que es homóloga al receptor activador de NFκB (RANK), inhibe la diferenciación de macrófagos en los osteoclastos y regula la resorción de los osteoclastos al actuar como un receptor señuelo soluble para el ligando de RANK (RANKL, también conocida como ligando OPG (OPGL)). Como resultado, el sistema OPG-RANK-RANKL juega un papel directo y esencial en la formación, función y supervivencia de los osteoclastos. El sistema OPG-RANK-RANKL también se ha demostrado que modula la migración de células de cáncer, controlando así el desarrollo de las metástasis óseas. Un experto en la técnica apreciará que OPG también se conoce como factor inhibidor de la osteoprotegerina y la osteoclastogénesis (OCIF).

Los equipos de ELISA adecuados para determinar la presencia o nivel de OPG en un suero, plasma, saliva o muestra de orina están disponibles de, por ejemplo, Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY), Immunodiagnostic Systems Ltd. (Baldon, Reino Unido), y BioVendor, LLC (Candler, Carolina del Norte).

3. Leptina

La leptina, un miembro de la familia adipocitoquinas de las citoquinas, es una hormona peptídica de 16 kD que juega un papel crítico en la regulación del peso corporal mediante la inhibición de la ingesta de alimentos y estimulación del gasto de energía. Se sintetiza principalmente por los adipocitos y circula en el plasma en cantidades proporcionales al contenido de grasa corporal (véase, por ejemplo, Maffei et al., Nat. Med., 1: 1155-1161 (1995); Considine et al., Diabetes, 45: 992-994 (1996)). La leptina muestra un alto grado de homología entre las diferentes especies y también es análogo en estructura a otras citoquinas (véase, por ejemplo, Madej et al., FEBS Lett., 373: 13-18 (1995)). La leptina actúa a través del receptor de leptina, un receptor transmembrana de dominio único de la superfamilia de receptores de citoquinas de clase I, que se caracterizan por motivos extracelulares de cuatro residuos de cisteína y un número de dominios fibronectina de tipo III (véase, por ejemplo, Heim, Eur. J. Clin. Invest., 26: 1-12 (1996)). El receptor de la leptina se sabe que existe como un homodímero y se activa por los cambios conformacionales que ocurren tras la unión del ligando al receptor (véase, por ejemplo, Devos et al., J. Biol. Chem., 272: 18304-18310 (1997)). Se han identificado hasta la fecha seis isoformas del receptor de leptina, generadas por corte y empalme alternativo, (véase, por ejemplo, Wang et al., Nature, 393: 684-688 (1998); Lee et al., Nature, 379: 632-635 (1996)).

Los equipos de ELISA adecuados para determinar la presencia o el nivel de leptina en una muestra biológica tal como suero, plasma, saliva u orina están disponibles, por ejemplo, de R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN), B-Bridge International (Mountain View, CA), Neogen Corp. (Lexington, KY), Assay Designs, Inc. (Ann Arbor, MI), Invitrogen (Camarillo, CA), CHEMICON International, Inc. (Temecula, CA), Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY), Linco Research, Inc. (St. Charles, MO), Diagnostic Systems Laboratories, Inc. (Webster, TX), Immuno-Biological Laboratories, Inc. (Minneapolis, MN), y Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI).

B. Factores de Crecimiento

También es útil la determinación de la presencia o nivel de uno o más factores de crecimiento en una muestra. Tal como se utiliza aquí, el término "factor de crecimiento" incluye cualquiera de una variedad de péptidos, polipéptidos o proteínas que son capaces de estimular la proliferación y/o diferenciación celular.

En ciertos aspectos, se determina en una muestra la presencia o nivel de al menos un factor de crecimiento, incluyendo, pero sin limitarse a, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF, también conocida como SERPINF1), anfirregulina (AREG, también conocida como factor de crecimiento derivado de schwannoma (SDGF)), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento transformante-α (TGF-α), factor de crecimiento transformante-β (TGF-β), proteínas morfogenéticas óseas (por ejemplo, BMP1-BMP15), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento del nervio β (β-NGF), factores neurotróficos (por ejemplo, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT3), neurotrofina 4 (NT4), etc.), factor de diferenciación del crecimiento -9 (GDF-9), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), miostatina (GDF-8), eritropoyetina (EPO), y la trombopoyetina (TPO). Preferiblemente, se determina la presencia o nivel de EGF, VEGF, PEDF, anfirregulina (SDGF), y/o BDNF.

En ciertos casos, se detecta la presencia o nivel de un factor de crecimiento particular a nivel de expresión de RNAm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En otros casos, se detecta la presencia o nivel de un factor de crecimiento particular a nivel de expresión de proteína utilizando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Los equipos de ELISA adecuados para determinar la presencia o nivel de un factor de crecimiento tales como EGF, VEGF, PEDF, SDGF, o BDNF en un suero, plasma, saliva o muestra de orina están disponibles de, por ejemplo, Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY), Promega (Madison, WI), R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN),

Invitrogen (Camarillo, CA), CHEMICON International, Inc. (Temecula, CA), Neogen Corp. (Lexington, KY), Pepro-Tech (Rocky Hill, NJ), Alpco Diagnostics (Salem, NH), Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL), y/o Abzyme (Needham, MA).

5 C. Lipocalinas

También es útil la determinación de la presencia o el nivel de uno o más lipocalinas en una muestra. Tal como se utiliza aquí, el término "lipocalina" incluye cualquiera de una variedad de pequeñas proteínas extracelulares que se caracterizan por varias propiedades comunes de reconocimiento molecular: la capacidad de unirse a una gama de pequeñas moléculas hidrofóbicas; la unión a receptores de la superficie celular específicos; y la formación de complejos con macromoléculas solubles (véase, por ejemplo, Flowers, *Biochem. J.*, 318: 1-14 (1996)). Las diversas funciones biológicas de las lipocalinas están mediadas por una o más de estas propiedades. La familia de proteínas de lipocalina presenta gran diversidad funcional, con roles en el transporte de retinol, coloración críptica de invertebrados, el olfato y el transporte de feromonas, y la síntesis de prostaglandinas. Las lipocalinas también están implicadas en la regulación de la homeostasis celular y la modulación de la respuesta inmune, y, como proteínas transportadoras, para actuar en la excreción general de compuestos endógenos y exógenos. Aunque las lipocalinas tienen una gran diversidad a nivel de secuencia, su estructura tridimensional es una característica unificadora. Las estructuras cristalinas de la lipocalina están muy conservadas y comprende un único barril beta antiparalelo de ocho hebras continuamente unidas por puentes de hidrógeno, que hospeda un sitio interno de unión al ligando.

En ciertos aspectos, se determina en una muestra la presencia o nivel de al menos una lipocalina incluyendo, pero sin limitarse a, lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL, también conocida como lipocalina de neutrófilos humanos (HNL) o lipocalina-2), la proteína de la glándula de von Ebner (VEGP, también conocida como lipocalina-1), la proteína fijadora del retinol (RBP), purpurina (PURP), proteína de fijación de ácido retinoico (RABP), α_{2u} -globulina (A2U), proteína urinaria principal (MUP), proteína de unión a bilina (BBP), crustacianina α , proteína de embarazo 14 (PP14), β -lactoglobulina (BLg), α 1-microglobulina (A1M), la cadena gamma de C8 (C8 γ), apolipoproteína D (ApoD), lazarillo (LAZ), la prostaglandina D2 sintasa (PGDS), proteína específica de quiescencia (QSP), proteína de plexo coroideo, proteína de unión a odorantes (OBP), α 1-glicoproteína ácida (AGP), probasina (PBAS), afrodisina, orosomucoide y proteína endometrial asociada a progestágeno (PAEP). En otros aspectos, se determina la presencia o nivel de al menos un complejo de lipocalina incluyendo, por ejemplo, un complejo de NGAL y una metaloproteínasa de matriz (por ejemplo, complejo NGAL/MMP-9). Preferiblemente, se determina la presencia o nivel de NGAL o uno de sus complejos con MMP-9.

En ciertos casos, se detecta la presencia o nivel de un lipocalina particular a nivel de la expresión de RNAm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En otros casos, se detecta la presencia o nivel de una lipocalina particular a nivel de expresión de proteína utilizando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Los equipos de ELISA adecuados para determinar la presencia o nivel de una lipocalina como NGAL en un suero, plasma o muestra de orina están disponibles, por ejemplo de, Antibodyshop A/S (Gentofte, Dinamarca), LabClinics SA (Barcelona, España), Lucerna- Chem AG (Lucerna, Suiza), R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN), y Assay Designs, Inc. (Ann Arbor, MI). Los equipos de ELISA adecuados para determinar la presencia o nivel de complejos NGAL/MMP-9 están disponibles, por ejemplo de, R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN). Técnicas de ELISA adicionales para NGAL y complejo NGAL/MMP-9 se describen en, por ejemplo, Kjeldsen et al., *Blood*, 83: 799-807 (1994); y Kjeldsen et al., *J. Immunol. Methods*, 198: 155-164 (1996).

D. Metaloproteinasas de la matriz

También es útil la determinación de la presencia o nivel de al menos una metaloproteínasa de matriz (MMP) en una muestra. Tal como se utiliza aquí, el término "metaloproteínasa de la matriz" o "MMP" incluye endopeptidasas dependientes de cinc capaces de degradar una variedad de proteínas de matriz extracelular, escindiendo los receptores de la superficie celular, liberando ligandos de apoptosis, y/o regulando quimiocinas. Las MMP también se cree que desempeñan un papel importante en los comportamientos celulares tales como la proliferación celular, la migración (adhesión/dispersión), la diferenciación, la angiogénesis y la defensa del huésped.

En ciertos aspectos, se determina en una muestra la presencia o nivel de al menos una MMP, incluyendo, pero sin limitarse a, MMP-1 (colagenasa intersticial), MMP-2 (gelatinasa A), MMP-3 (estromelisin-1), MMP-7 (matrilisina), MMP-8 (colagenasa de los neutrófilos), MMP-9 (gelatinasa B), MMP-10 (estromelisin-2), MMP-11 (estromelisin-3), MMP-12 (metaloelastasa de macrófagos), MMP-13 (colagenasa-3), MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-18 (colagenasa-4), MMP-19, MMP-20 (enamelin-1), MMP-21, MMP-23, MMP-24, MMP-25, MMP-26 (matrilisina-2), MMP-27 y MMP-28 (epilisin-1). Preferiblemente, se determina la presencia o nivel de MMP-9.

En ciertos casos, se detecta la presencia o el nivel de una MMP particular a nivel de la expresión de RNAm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En otros casos, se detecta la presencia o el nivel de una MMP particular, a nivel de expresión de proteína utilizando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Los equipos de ELISA adecuados para determinar la presencia o nivel de una MMP tales como MMP-9 en una muestra de suero o plasma están disponibles de, por ejemplo, Calbiochem (San Diego, CA), Chemicon International, Inc. (Temecula, CA), y R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN).

E. Inhibidor tisular de metaloproteinasas

También es útil la determinación de la presencia o nivel de al menos un inhibidor tisular de la metaloproteinasa (TIMP) en una muestra. Tal como se utiliza aquí, el término "inhibidor tisular de la metaloproteinasa" o "TIMP" incluye proteínas capaces de inhibir las MMP.

En ciertos aspectos, se determina en una muestra la presencia o nivel de al menos uno al menos un TIMP incluyendo, pero sin limitarse a, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. Preferiblemente, se determina la presencia o nivel de TIMP-1.

En ciertos casos, se detecta la presencia o nivel de un TIMP particular a nivel de la expresión de RNAm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En otros casos, se detecta la presencia o nivel de un TIMP particular a nivel de expresión de proteína utilizando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Los equipos de ELISA adecuados para determinar la presencia o nivel de un TIMP tales como TIMP-1 en una muestra de suero o plasma están disponibles de, por ejemplo, Alpco Diagnostics (Salem, NH), Calbiochem (San Diego, CA), Invitrogen (Camarillo, CA), CHEMICON International, Inc. (Temecula, CA), y R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN).

F. Globulinas

También es útil la determinación de la presencia o nivel de al menos una globulina en una muestra. Tal como se utiliza aquí, el término "globulina" incluye cualquier miembro de una serie heterogénea de familias de proteínas de suero que migran menos que la albúmina de suero durante la electroforesis. La electroforesis de proteínas normalmente se utiliza para categorizar las globulinas en las siguientes tres categorías: alfa-globulinas (es decir, las alfa-1-globulinas o alfa-2-globulinas); beta-globulinas; y gammaglobulinas.

Las alfa-globulinas comprenden un grupo de proteínas globulares en plasma que son altamente móviles en soluciones alcalinas o cargadas eléctricamente. Por lo general, funcionan inhibiendo ciertas proteasas de la sangre y actividades inhibitorias. Ejemplos de alfa-globulinas incluyen, pero no se limitan a, alfa-2-macroglobulina (α 2-MG), haptoglobina (Hp), orosomucoide, alfa-1-antitripsina, alfa-1-antiquimotripsina, alfa-2-antiplasmina, antitrombina, ceruloplasmina, cofactor II de la heparina, proteína de unión a retinol y transcortina. Preferiblemente, se determina la presencia o nivel de α 2-MG, haptoglobina, y/o orosomucoide. En ciertos casos, se determinan uno o más alotipos de haptoglobina, tales como, por ejemplo, precursor de Hp, Hp β , Hp α 1, y Hp α 2.

En ciertos casos, se detecta la presencia o el nivel de una globulina particular a nivel de expresión de RNAm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En otros casos, se detecta la presencia o el nivel de una globulina particular a nivel de expresión de proteína utilizando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Los equipos de ELISA adecuados para determinar la presencia o el nivel de una globulina tales como α 2-MG, haptoglobina, o orosomucoide en un suero, plasma, o muestra de orina están disponibles de, por ejemplo, Genway Biotech, Inc. (San Diego, CA) y/o Immundiagnostik AG (Bensheim, Alemania)

G. Proteínas fragmentadoras de actina

También es útil la determinación de la presencia o nivel de al menos una proteína fragmentadora de actina en una muestra. Tal como se utiliza aquí, el término "proteína fragmentadora de actina" incluye cualquier miembro de una familia de proteínas implicadas en la remodelación de la actina y la regulación de la motilidad celular. Los ejemplos no limitantes de proteínas fragmentadoras de actina incluyen gelsolina (también conocida como brevina o factor de despolimerización de la actina), vilina, fragmina, y adseverina. Por ejemplo, la gelsolina es una proteína de leucocitos, plaquetas y otras células que cortan los filamentos de actina en presencia de calcio submicromolar, aislando de ese modo geles de actina citoplásmica.

En ciertos casos, se detecta la presencia o el nivel de una proteína fragmentadora de actina particular a nivel de la expresión de RNAm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En otros casos, se detecta la presencia o el nivel de una proteína fragmentadora de actina en particular a nivel de expresión de proteína utilizando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Las técnicas de ELISA adecuadas para determinar la presencia o el nivel de una

proteína fragmentadora de actina tales como gelsolina en una muestra de plasma se describen en, por ejemplo, Smith et al., J. Lab. Clin. Med., 110: 189-195 (1987); y Hiyoshi et al., Biochem. Mol. Biol. Int., 32: 755-762 (1994).

5 H. Proteínas S100

También es útil la determinación de la presencia o nivel de al menos una proteína S100 en una muestra. Tal como se utiliza aquí, el término "proteína S100" incluye cualquier miembro de una familia de proteínas ácidas de baja masa molecular caracterizadas por la expresión específica del tipo celular y la presencia de 2 dominios
10 mano EF de unión a calcio. Hay por lo menos 21 tipos diferentes de proteínas S100 en los seres humanos. El nombre se deriva del hecho de que las proteínas S100 son 100% solubles en sulfato de amonio a pH neutro. La mayoría de las proteínas S100 son homodiméricas, que consiste en dos polipéptidos idénticos que se mantienen unidos por enlaces no covalentes. Aunque las proteínas S100 son estructuralmente similares a la calmodulina, difieren en que son específicas de la célula, expresada en células particulares a diferentes niveles
15 dependiendo de factores ambientales. Las proteínas S-100 están normalmente presentes en las células derivadas de la cresta neural (por ejemplo, células de Schwann, melanocitos, células gliales), condrocitos, adipocitos, células mioepiteliales, macrófagos, células de Langerhans, células dendríticas, y queratinocitos. Las proteínas S100 están implicadas en una variedad de funciones intracelulares y extracelulares tales como la regulación de la fosforilación de proteínas, factores de transcripción, homeostasis del Ca^{2+} , la dinámica de los
20 componentes del citoesqueleto, actividades enzimáticas, el crecimiento y la diferenciación celular, y la respuesta inflamatoria.

La calgranulina es una proteína S100 que se expresa en múltiples tipos de células, incluyendo las células epiteliales renales y neutrófilos, y son abundantes en la infiltración de monocitos y granulocitos en condiciones
25 de inflamación crónica. Ejemplos de calgranulinas incluyen, sin limitación, calgranulina A (también conocida como S100A8 o MRP-8), calgranulina B (también conocida como S100A9 o MRP-14), y calgranulina C (también conocida como S100A12).

En ciertos casos, se detecta la presencia o el nivel de una proteína S100 particular a nivel de la expresión de
30 RNAm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En otros casos, se detecta la presencia o el nivel de una proteína S100 particular a nivel de expresión de proteína utilizando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Los equipos de ELISA adecuados para determinar la presencia o el nivel de una proteína S100 como calgranulina A (S100A8) o calgranulina B (S100A9) en un suero, plasma, o muestra de orina están disponibles de, por ejemplo,
35 Península Laboratories Inc. (San Carlos, CA) y HyCult biotechnology b.v. (Uden, Países Bajos).

La calprotectina, el complejo de S100A8 y S100A9, es una proteína de unión de calcio y al zinc en el citosol de neutrófilos, monocitos, y queratinocitos. La calprotectina es una proteína importante en granulocitos neutrófilos y macrófagos y representa tanto como el 60% de la proteína total en la fracción citosol en estas células. Por tanto,
40 es un marcador alternativo del recambio de neutrófilos. Su concentración en las heces se correlaciona con la intensidad de la infiltración de neutrófilos de la mucosa intestinal y con la gravedad de la inflamación. En algunos casos, la calprotectina se puede medir con un ELISA usando pequeñas muestras fecales (50-100 mg) (véase, por ejemplo, Johnne et al., Scand. J. Gastroenterol., 36: 291-296 (2001)).

45 I. Taquiquininas

También es útil la determinación de la presencia o nivel de al menos una de las taquiquininas en una muestra. Tal como se utiliza aquí, el término "taquiquinina" incluye neuropéptidos amidados que comparten la secuencia
50 carboxi-terminal de Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂. Las taquiquininas se unen normalmente a uno o más receptores de taquiquinina (por ejemplo, TACR1, TACR2, y/o TACR3).

En ciertos aspectos, se determina en una muestra la presencia o nivel de al menos una de las taquiquininas, incluyendo, pero sin limitarse a, la sustancia P, neuroquinina A, y la neuroquinina B. Preferiblemente, se determina la presencia o el nivel de la sustancia P. La sustancia P es un péptido de 11 aminoácidos de longitud
55 que es liberada por las terminaciones nerviosas tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. Entre los numerosos sitios biológicos inervados por las neuronas liberadoras de sustancias P están la piel, los intestinos, el estómago, la vejiga, y el sistema cardiovascular.

En ciertos casos, se detecta la presencia o nivel de un taquiquinina particular a nivel de la expresión de RNAm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En otros casos, se detecta la presencia o nivel de un taquiquinina particular a nivel de expresión de proteína utilizando,
60 por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Los equipos de ELISA adecuados para determinar la presencia o nivel de una de las taquiquininas tales como la sustancia P en un suero, plasma, saliva o muestra de orina están disponibles de, por ejemplo, MD Biosciences Inc. (St. Paul, MN), Assay Designs, Inc. (Ann Arbor, MI), R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN), Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO), y Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI).

J. Grelina

También es útil la determinación de la presencia o el nivel de grelina en una muestra. Tal como se utiliza aquí, el término "grelina" incluye un péptido de 28 aminoácidos que es un ligando endógeno para el receptor de secretagogos de la hormona del crecimiento (GHSR) y está involucrada en la regulación de la liberación de la hormona de crecimiento. La grelina se puede acilar, normalmente con un grupo n-octanoilo en el residuo tres de serina, para formar grelina activa. Alternativamente, la grelina puede existir como una forma sin acilar (es decir, desacilgrelina). La grelina se expresa principalmente en las células enterocromafines especializadas situadas principalmente en la mucosa del fondo del estómago y tiene efectos metabólicos opuestos a los de la leptina. La grelina estimula la ingesta de alimentos, mejora el uso de hidratos de carbono y reduce la utilización de grasas, aumenta la motilidad gástrica y la secreción de ácido, y reduce la actividad locomotora.

En ciertos casos, se detecta la presencia o el nivel de grelina a nivel de expresión de RNAm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En otros casos, se detecta la presencia o el nivel de grelina a nivel de expresión de proteína utilizando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Los equipos de ELISA adecuados para determinar la presencia o nivel de grelina activa o desacil-grelina en un suero, plasma, saliva o muestra de orina están disponibles de, por ejemplo, Alpco Diagnostics (Salem, NH), Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI), Linco Research, Inc. (St. Charles, MO), y Diagnostic Systems Laboratories, Inc. (Webster, TX).

K. Neurotensina

También es útil la determinación de la presencia o nivel de neurotensina en una muestra. Tal como se utiliza aquí, el término "neurotensina" incluye un tridecapéptido que es ampliamente distribuido en todo el sistema nervioso central y el tracto gastrointestinal. La neurotensina ha sido identificada como un importante mediador en el desarrollo y la progresión de varias funciones gastrointestinales y condiciones de enfermedad, que ejercen sus efectos mediante la interacción con receptores específicos que actúan directa o indirectamente sobre los nervios, células epiteliales, y/o células de los sistemas inmune e inflamatorio (véase, por ejemplo, Zhao et al., Peptides, 27: 2434-2444 (2006)).

En ciertos casos, se detecta la presencia o nivel de neurotensina a nivel de expresión de RNAm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En otros casos, se detecta la presencia o nivel de neurotensina a nivel de expresión de proteína utilizando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Las técnicas de ELISA adecuadas para determinar la presencia o nivel de neurotensina en una muestra se describen en, por ejemplo, Davis et al., J. Neurosci. Methods, 14: 15-23 (1985); y Williams et al., J. Histochem. Cytochem, 37: 831-841 (1989).

L. Hormona liberadora de corticotropina

También es útil la determinación de la presencia o nivel de la hormona liberadora de corticotropina (CRH; también conocida como factor liberador de corticotropina o CRF) en una muestra. Tal como se utiliza aquí, el término "hormona liberadora de corticotropina", "CRH", "factor liberador de corticotropina," o "CRF" incluye un péptido de 41 aminoácidos secretado por el núcleo paraventricular del hipotálamo que media la parte proximal de la respuesta al estrés en los mamíferos como los humanos. CRH normalmente se une a uno o más receptores de la hormona liberadora de corticotropina (por ejemplo, CRHR1 y/o CRHR2). CRH se expresa por el hipotálamo, la médula espinal, estómago, bazo, duodeno, glándula suprarrenal, y la placenta.

En ciertos casos, se detecta la presencia o nivel de CRH a nivel de expresión de RNAm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En otros casos, se detecta la presencia o nivel de CRH a nivel de expresión de proteína utilizando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Los equipos de ELISA adecuados para determinar la presencia o nivel de CRH en un suero, plasma, saliva o muestra de orina están disponibles de, por ejemplo, Alpco Diagnostics (Salem, NH) y Cosmo Bio Co., Ltd. (Tokio, Japón).

M. Anticuerpos antineutrófilos

También es útil la determinación de los niveles de ANCA y/o la presencia o ausencia de pANCA en una muestra es también útil. Tal como se utiliza aquí, el término "anticuerpo citoplásmico anti-neutrófilo" o "ANCA" incluye anticuerpos dirigidos a los componentes citoplasmáticos y/o nucleares de los neutrófilos. La actividad de ANCA se puede dividir en varias categorías amplias basadas en el patrón de tinción ANCA en los neutrófilos: (1) la tinción citoplásmica de neutrófilos sin resaltado perinuclear (cANCA); (2) la tinción perinuclear alrededor del borde exterior del núcleo (pANCA); (3) la tinción perinuclear alrededor del borde interior del núcleo (NSNA); y (4) la tinción difusa con moteado en todo el neutrófilo (SAPPA). En ciertos casos, la tinción de pANCA es sensible al tratamiento con DNasa. El término ANCA abarca todas las variedades de reactividad anti-neutrófilos,

incluyendo, pero sin limitarse a, cANCA, pANCA, NSNA, y SAPPA. Del mismo modo, el término ANCA abarca todos los isotipos de inmunoglobulina incluyendo, sin limitación, la inmunoglobulina A y G.

Los niveles de ANCA en una muestra de un individuo se pueden determinar, por ejemplo, usando un inmunoensayo tal como un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) con neutrófilos fijados con alcohol. La presencia o ausencia de una categoría particular de ANCA como pANCA se puede determinar, por ejemplo, usando un ensayo inmunohistoquímico tal como un ensayo indirecto con anticuerpo fluorescente (IFA). Preferiblemente, la presencia o ausencia de pANCA en una muestra se determina usando un ensayo de inmunofluorescencia con neutrófilos fijados tratados con DNasa. Además de neutrófilos fijados, los antígenos específicos para ANCA que son adecuados para determinar los niveles de ANCA incluyen, sin limitación, extractos no purificados o parcialmente purificados de neutrófilos; proteínas purificadas, fragmentos de proteínas, o péptidos sintéticos, tales como la histona H1 o fragmentos reactivos a ANCA de los mismos (ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.074.835); antígenos similares a la histona H1, antígenos de porina, antígenos Bacteroides, o fragmentos reactivos a ANCA de los mismos (ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.033.864); antígenos de vesículas secretoras o fragmentos reactivos a ANCA de los mismos (ver, por ejemplo, la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 08/804.106); y anticuerpos idiotípicos anti-ANCA. Un experto en la técnica apreciará que se describe el uso de antígenos adicionales específicos para ANCA.

N. Anticuerpos anti *Saccharomyces cerevisiae*

También es útil la determinación de los niveles de ASCA (por ejemplo, ASCA-IgA y/o ASCA-IgG) en una muestra. Tal como se utiliza aquí, el término "inmunoglobulina A anti-*Saccharomyces cerevisiae*" o "ASCA-IgA" incluye anticuerpos de inmunoglobulina de isotipo A que reaccionan específicamente con *S. cerevisiae*. Del mismo modo, el término "inmunoglobulina G anti-*Saccharomyces cerevisiae*" o "ASCA-IgG" incluye anticuerpos de inmunoglobulina de isotipo G que reaccionan específicamente con *S. cerevisiae*.

La determinación de si una muestra es positiva para ASCA IgA o ASCA IgG se realiza mediante un antígeno específico para ASCA. Dicho antígeno puede ser cualquier antígeno o mezcla de antígenos que se une específicamente a ASCA IgA y/o ASCA IgG. Aunque los anticuerpos ASCA se caracterizaron inicialmente por su capacidad para unirse a *S. cerevisiae*, los expertos en la técnica entenderán que un antígeno que se une específicamente a ASCA se puede obtener de *S. cerevisiae* o de una variedad de otras fuentes siempre y cuando la antígeno sea capaz de unirse específicamente a los anticuerpos ASCA. Por consiguiente, las fuentes ejemplares de un antígeno específico para ASCA, que se puede utilizar para determinar los niveles de ASCA-IgA y/o ASCA-IgG en una muestra, incluyen, sin limitación, células enteras muertas de levadura tales como *Saccharomyces* o células de *Candida*; manano de pared celular de levadura tales como fosfopeptidomanano (PPM); oligosacáridos tales como oligomanósidos; neoglucolípidos; anticuerpos idiotípicos anti-ASCA; y similares. Diferentes especies y cepas de levadura, tales como la cepa de *S. cerevisiae* Sul, SU2, CBS 1315, o BM 156, o *Candida albicans* cepa VW32, son adecuadas para su uso como antígeno específico para ASCA-IgA y/o ASCA-IgG. Los antígenos purificados y sintéticos específicos para ASCA también son adecuados para su uso en la determinación de los niveles de ASCA-IgA y/o ASCA-IgG en una muestra. Ejemplos de antígenos purificados incluyen, sin limitación, los antígenos de oligosacáridos purificados, tales como oligomanósidos. Ejemplos de antígenos sintéticos incluyen, sin limitación, oligomanósidos sintéticos, tales como los descritos en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20030105060, por ejemplo, D-Man β (1-2) D-Man β (1-2) D-Man β (1-2) D-Man-OR, D-Man α (1-2) D-Man α (1-2) D-Man α (1-2) D-Man-OR y D-Man α (1-3) D-Man α (1-2) D-Man α (1-2) D-Man-OR, en donde R es un átomo de hidrógeno, un alquilo de C₁ a C₂₀, o un grupo conector opcionalmente marcado.

Se pueden utilizar preparaciones de mananos de pared celular de levadura, por ejemplo, PPM, en la determinación de los niveles de ASCA-IgA y/o ASCA-IgG en una muestra. Tales antígenos de superficie hidrosolubles se pueden preparar mediante cualquier técnica de extracción apropiada conocida en la técnica, incluyendo, por ejemplo, por autoclave, o se pueden obtener comercialmente (véase, por ejemplo, Lindberg et al., Gut., 33: 909-913 (1992)). La fracción estable al ácido de PPM también es útil en los algoritmos estadísticos (Sendid et al., Clin. Diag. Lab. Immunol., 3: 219-226 (1996)). Un PPM ejemplar que es útil en la determinación de los niveles de ASCA en una muestra deriva de la cepa de *S. uvarum* ATCC # 38926.

Los antígenos de oligosacárido purificados, tales como oligomanósidos también pueden ser útiles en la determinación de los niveles de ASCA-IgA y/o ASCA-IgG en una muestra. Los antígenos de oligomanósido purificados se convierten preferiblemente en neoglucolípidos como se describe en, por ejemplo, Faille et al., Eur. J. Microbiol. Infect. Dis., 11: 438-446 (1992). Un experto en la técnica entiende que la reactividad de tal antígeno de oligomanósido con ASCA se puede optimizar variando la longitud de la cadena de manosilo (Frosh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 1194-1198 (1985)); la configuración anomérica (Fukazawa et al., en "Immunology of Fungal Disease," E. Kurstak (ed), Marcel Dekker Inc., Nueva York, pp 37-62 (1989); Nishikawa et al., Microbiol Immunol., 34: 825-840 (1990); Poulain et al., Eur. J. Clin. Microbiol., 23: 46-52 (1993); Shibata et al., Arch. Biochem. Biophys., 243: 338-348 (1985); Trinell et al., Infect. Immun., 60: 3845-3851 (1992)); o la posición del enlace (Kikuchi et al., Planta, 190: 525-535 (1993)).

Los oligomanósidos adecuados para utilizar en los métodos incluyen, sin limitación, un oligomanósido que tiene la manotetraosa Man(1-3) Man(1-2) Man(1-2) Man. Tal oligomanósido puede purificarse a partir de PPM como se describe en, por ejemplo, Faille et al., Supra. Un ejemplo de neoglucolípido específico para ASCA se puede construir mediante la liberación del oligomanósido de su PPM respectivo y posteriormente acoplar el oligomanósido liberado a 4-hexadecilanilina o similares.

O. Anticuerpos antimicrobianos

También es útil la determinación de los niveles de anticuerpos anti-OmpC en una muestra. Tal como se utiliza aquí, el término "anticuerpo anti-proteína de membrana externa C" o "anticuerpo anti-OmpC" incluye anticuerpos dirigidos a una porina de membrana externa bacteriana como se describe en, por ejemplo, la Publicación de Patente PCT No. WO 01/89361. El término "proteína de membrana externa C" o "OmpC" se refiere a una porina bacteriana que es inmunorreactiva con un anticuerpo anti-OmpC.

El nivel de anticuerpo anti-OmpC presente en una muestra de un individuo se puede determinar utilizando una proteína OmpC o un fragmento de la misma como un fragmento inmunorreactivo de la misma. Los antígenos OmpC adecuados útiles en la determinación de los niveles de anticuerpos anti-OmpC en una muestra incluyen, sin limitación, una proteína OmpC, un polipéptido OmpC que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la proteína OmpC, o un fragmento del mismo tal como un fragmento inmunoreactivo del mismo. Como se usa en el presente documento, un polipéptido OmpC generalmente describe polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos con una identidad mayor que aproximadamente el 50%, preferiblemente mayor que aproximadamente el 60% de identidad, más preferiblemente mayor que aproximadamente el 70% de identidad, todavía más preferiblemente mayor que aproximadamente el 80%, 85 %, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con una proteína OmpC, con la identidad de aminoácidos determinada utilizando un programa de alineamiento de secuencias tales como CLUSTALW. Tales antígenos se pueden preparar, por ejemplo, mediante purificación a partir de bacterias entéricas, tales como E. coli, por expresión recombinante de un ácido nucleico tal como Genbank N° de acceso K00541, por medio de síntesis tal como una solución o síntesis de péptidos en fase sólida, o mediante el uso de presentación de fagos.

También es útil la determinación de niveles de anticuerpos anti-I2 en una muestra. Tal como se utiliza aquí, el término "anticuerpo anti-I2" incluye anticuerpos dirigidos a un antígeno microbiano que comparte homología con los reguladores transcripcionales bacterianos como se describen en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.309.643. El término "I2" se refiere a un antígeno microbiano que es inmunorreactivo con un anticuerpo anti-I2. La proteína microbiana I2 es un polipéptido de 100 aminoácidos que comparte cierta similitud de homología con la proteína predicha 4 de C. pasteurianum, Rv3557c de Mycobacterium tuberculosis, y un regulador transcripcional de Aquifex aeolicus. Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas para la proteína I2 se describen en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.309.643.

El nivel de anticuerpo anti-I2 presente en una muestra de un individuo se puede determinar utilizando una proteína I2 o un fragmento de la misma tal como un fragmento inmunorreactivo de la misma. Los antígenos I2 adecuados útiles en la determinación de los niveles de anticuerpos anti-I2 en una muestra incluyen, sin limitación, una proteína I2, un polipéptido I2 que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la proteína I2, o un fragmento del mismo tal como un fragmento inmunoreactivo de esta. Tales polipéptidos I2 presentan una mayor similitud de secuencia a la proteína I2 que a la proteína 4 de C. pasteurianum, e incluyen variantes de isotipo y homólogos de los mismos. Tal como se usa en el presente documento; un polipéptido I2 generalmente describe polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos con una identidad mayor que aproximadamente el 50%, preferiblemente mayor que aproximadamente el 60% de identidad, más preferiblemente mayor que aproximadamente el 70% de identidad, todavía más preferiblemente mayor que aproximadamente el 80%, 85%, 90% , 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con una proteína I2 de origen natural, con la identidad de aminoácidos determinada utilizando un programa de alineamiento de secuencias tales como CLUSTALW. Tales antígenos I2 se pueden preparar, por ejemplo, mediante purificación a partir de los microbios, por expresión recombinante de un ácido nucleico que codifica un antígeno I2, por medios sintéticos, tales como síntesis de péptidos en fase sólida o solución, o mediante el uso de presentación en fagos.

También es útil la determinación de los niveles de anticuerpos anti-flagelina en una muestra. Tal como se utiliza aquí, el término "anticuerpo anti-flagelina" incluye anticuerpos dirigidos a un componente de proteína de flagelos bacterianos como se describe en, por ejemplo, la Publicación de Patente PCT N° WO 03/053220 y la publicación de patente N° 20040043931. El término "flagelina" se refiere a una proteína de flagelo bacteriano que es inmunorreactiva con un anticuerpo anti-flagelina. Las flagelinas microbianas son proteínas que se encuentran en el flagelo bacteriano que se organizan a sí mismas en un cilindro hueco para formar el filamento.

El nivel de anticuerpo anti-flagelina presente en una muestra de un individuo se puede determinar utilizando una proteína flagelina o un fragmento del mismo tal como un fragmento inmunorreactivo de la misma. Antígenos de flagelina adecuados útiles en la determinación de los niveles de anticuerpos anti-flagelina en una muestra

incluyen, sin limitación, una proteína flagelina como flagelina Cbir-1, flagelina X, flagelina A, flagelina B, fragmentos de los mismos, y combinaciones de los mismos, un polipéptido de flagelina que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la proteína flagelina, o un fragmento de la misma tal como un fragmento inmunoreactivo de la misma. Tal como se usa en el presente documento, un polipéptido de flagelina generalmente describe un polipéptido que tienen una secuencia de aminoácidos con una identidad mayor que aproximadamente el 50%, preferiblemente mayor que aproximadamente el 60% de identidad, más preferiblemente mayor que aproximadamente el 70% de identidad, todavía más preferiblemente mayor que aproximadamente el 80%, 85 %, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con una proteína flagelina de origen natural, con la identidad de aminoácidos determinada utilizando un programa de alineamiento de secuencias tales como CLUSTALW. Tales antígenos de flagelina se pueden preparar, por ejemplo, mediante purificación a partir de bacterias tal como *Helicobacter bilis*, *Helicobacter mustelae*, *Helicobacter pylori*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, y bacterias que se encuentran en el ciego, por expresión recombinante de un ácido nucleico que codifica un antígeno de flagelina, por medio de síntesis tales como síntesis de péptidos en fase sólida o solución, o mediante el uso de presentación en fagos.

P. Otros marcadores de diagnóstico

También es útil la determinación de la presencia o el nivel de lactoferrina en una muestra. En ciertos casos, se detecta la presencia o el nivel de lactoferrina a nivel de expresión de RNAm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En otros casos, se detecta la presencia o el nivel de lactoferrina a nivel de expresión de proteína utilizando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Un equipo de ELISA para lactoferrina disponible de Calbiochem (San Diego, CA) puede utilizarse para detectar la lactoferrina humana en una muestra de plasma, orina, lavado broncoalveolar, o de líquido cefalorraquídeo. Del mismo modo, un equipo de ELISA disponible de US Biological (Swampscott, MA) se puede utilizar para determinar el nivel de lactoferrina en una muestra de plasma. La publicación de patente US N° 20040137536 describe un ensayo ELISA para determinar la presencia de niveles de lactoferrina elevada en una muestra de heces. Asimismo, la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20040033537 describe un ensayo ELISA para determinar la concentración de lactoferrina endógena en una muestra de heces, moco o de bilis. La presencia o el nivel de anticuerpos anti-lactoferrina pueden ser detectados en una muestra usando, por ejemplo, la proteína lactoferrina o un fragmento de la misma.

Los inmunoensayos tales como ELISA también son particularmente útiles para determinar la presencia o nivel de proteína C reactiva (CRP) en una muestra. Por ejemplo, un ensayo colorimétrico ELISA en sándwich disponible de Alpc Diagnostics (Salem, NH) se puede utilizar para determinar el nivel de CRP en una muestra de suero, plasma, orina, o heces. Del mismo modo, un equipo de ELISA disponible de Biomedica Corporation (Foster City, CA) se puede utilizar para detectar los niveles de PCR en una muestra. Otros métodos para la determinación de los niveles de PCR en una muestra se describen en, por ejemplo, las patentes US n° 6.838.250 y 6.406.862; y la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20060024682 y 20060019410.

Además, el hemocultivo, sangre oculta en heces, a menudo es indicativo de enfermedad gastrointestinal y se han desarrollado diversos equipos para controlar la hemorragia gastrointestinal. Por ejemplo, Hemocult SENA, un producto de Beckman Coulter, es una ayuda de diagnóstico para la hemorragia gastrointestinal, la deficiencia de hierro, úlceras pépticas, colitis ulcerosa, y, en algunos casos, en el cribado para el cáncer colorrectal. Este ensayo particular se basa en la oxidación de guayaco por el peróxido de hidrógeno para producir un color azul. Un ensayo colorimétrico similar está disponible comercialmente de Helena Laboratories (Beaumont, TX) para la detección de sangre en muestras de heces. Otros métodos para la detección de sangre oculta en una muestra de heces mediante la determinación de la presencia o nivel de hemoglobina o la actividad de hemo se describen en, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 4.277.250, 4.920.045, 5.081.040, y 5.310.684.

También es útil la determinación de la presencia o nivel de fibrinógeno o un producto proteolítico del mismo tal como un fibrinopéptido en una muestra. El fibrinógeno es una glicoproteína plasmática sintetizada en el hígado compuesto por 3 subunidades estructuralmente diferentes: alfa (FGA); beta (FGB); y gamma (FGG). La trombina produce una proteólisis limitada de la molécula de fibrinógeno, durante el cual los fibrinopéptidos A y B se liberan de las regiones N-terminales de las cadenas alfa y beta, respectivamente. Los fibrinopéptidos A y B, que se han secuenciado en muchas especies, pueden tener un papel fisiológico como vasoconstrictores y puede ayudar en la hemostasia local durante la coagulación de la sangre. El fibrinopéptido A humano puede comprender la secuencia: Ala-Ser-Gly Asp-Glu-Gly-Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Val-Arg (Id. de Sec. N°: 1). El fibrinopéptido B humano también puede comprender la secuencia: Glp-Gly-Val-Asn-Asp-Asn-Glu-Glu-Gly-Phe-Phe-Ser-Ala-Arg (Id. de Sec. N°: 2). Un equipo de ELISA disponible de American Diagnostica Inc. (Stamford, CT) se puede utilizar para detectar la presencia o nivel de fibrinopéptido A humano en el plasma u otros fluidos biológicos.

También es útil la determinación de la presencia o nivel de péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) en una muestra. La calcitonina es una hormona peptídica de 32 aminoácidos sintetizada por las células parafoliculares de la glándula tiroides. Esta provoca la reducción del calcio sérico, un efecto opuesto a la de la

hormona paratiroidea. CGRP deriva, con calcitonina, a partir del gen CT/CGRP localizado en el cromosoma 11. CGRP es un péptido de 37 aminoácidos y es un vasodilatador endógeno potente. CGRP se produce principalmente en el tejido nervioso; sin embargo, sus receptores se expresan por todo el cuerpo. Un equipo de ELISA disponible en Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI) se puede usar para detectar la presencia o nivel de CGRP humano en una variedad de muestras incluyendo plasma, suero, tejido nervioso, CSF, y medios de cultivo.

También es útil la determinación de la presencia o nivel de un anticuerpo anti-transglutaminasa tisular (tTG) en una muestra. Tal como se utiliza aquí, el término "anticuerpo anti-tTG" incluye cualquier anticuerpo que reconoce la transglutaminasa tisular (tTG) o un fragmento de la mismo. Las transglutaminasas son una familia amplia de enzimas dependientes Ca^{2+} que son ubicuas y altamente conservadas entre especies. De todas las transglutaminasas, tTG es la más ampliamente distribuida. En ciertos casos, el anticuerpo anti-tTG es un anticuerpo IgA anti-tTG, anticuerpo IgG anti-tTG, o mezclas de los mismos. Un equipo de ELISA disponible de ScheBo Biotech USA Inc. (Marietta, GA) se puede utilizar para detectar la presencia o el nivel de anticuerpos IgA anti-tTG humana en una muestra de sangre.

También es útil la determinación de la presencia de polimorfismos en el gen NOD2/CARD15 en una muestra. Por ejemplo, los polimorfismos en el gen NOD2 tales como una variante de nucleótidos C2107T que resulta en una variante de la proteína R703W se pueden identificar en una muestra de un individuo (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20030190639). Alternativamente, los niveles de RNAm de NOD2 se pueden utilizar como un marcador de diagnóstico para ayudar en la clasificación de SII.

También es útil la determinación de la presencia de polimorfismos en los genes del transportador de la recaptación de serotonina (SERT) en una muestra. Por ejemplo, los polimorfismos en la región promotora del gen SERT tienen efectos sobre la actividad transcripcional, dando como resultado una eficiencia de la recaptación de 5-HT alterada. Se ha demostrado la observación de una asociación genotípica fuerte entre el genotipo supresión/supresión SERT-P y el fenotipo SII (véase, por ejemplo, Yeo Gut, 53: 1396-1399 (2004)). Alternativamente, los niveles de RNAm de SERT se pueden utilizar como un marcador de diagnóstico para ayudar en la clasificación del SII (véase, por ejemplo, Gershon, J. Clin. Gastroenterol., 39 (5 Supl.): S184-193 (2005)).

En ciertos aspectos, el nivel de mRNA de triptófano hidroxilasa-1 es un marcador de diagnóstico. Por ejemplo, se ha demostrado que el mRNA de triptófano hidroxilasa-1 está reducido significativamente en SII (véase, por ejemplo, Coats, Gastroenterology, 126: 1897-1899 (2004)). En ciertos otros aspectos, una prueba de aliento de lactulosa para medir metano, que es indicativa de sobrecrecimiento bacteriano, puede utilizarse como un marcador de diagnóstico para SII.

Marcadores de diagnóstico adicionales incluyen, pero no se limitan a, L-selectina/CD62L, autoanticuerpos anti-U1-70 kDa, zona occludens 1 (ZO-1), péptido intestinal vasoactivo (VIP), suero amiloide A, gastrina, polimorfismos de genes NB3, polimorfismos de genes NC11, leucocitos fecales, polimorfismos de genes adrenérgicos $\alpha 2A$ y $\alpha 2c$, polimorfismos de genes IL-10, polimorfismos de genes TNF- α , polimorfismos del gen TGF- $\beta 1$, receptores α -adrenérgicos, proteínas G, polimorfismos de genes 5-HT $_{2A}$, polimorfismos de genes LPR 5-HTT, polimorfismos del gen del receptor 5-HT $_4$, zonulina y el péptido 33-mero (Shan et al., Science, 297: 2275-2279. (2002); Publicación de Patente PCT N° WO 03/068170).

VI. Marcadores de clasificación

Una serie de marcadores de clasificación son adecuados para utilizar en los métodos, sistemas, y código para clasificar el SII dentro de una categoría, forma, o subtipo clínico tal como, por ejemplo, SII-estreñimiento (SII-C), SII-diarrea (SII-D), SII-mixto (SII-M), SII-alterna (SII-A), o SII post-infeccioso (SII-PI). Ejemplos de marcadores de clasificación incluyen, sin limitación, cualquiera de los marcadores de diagnóstico descritos anteriormente (por ejemplo, la leptina, el transportador de la recaptación de serotonina (SERT), triptófano 1-hidroxilasa, 5-hidroxitriptamina (5-HT), y similares), así como la proteína de la mucosa del antro 8, queratina 8, claudina-8, zonulina, receptor 1 de la hormona liberadora de corticotropina (CRHR1), receptor 2 de la hormona liberadora de corticotropina (CRHR2), y similares.

Por ejemplo, el Ejemplo 1 ilustra que la medición de los niveles de leptina es particularmente útil para distinguir muestras de pacientes SII-C de muestras de pacientes SII-A y SII-D. Además, la expresión de SERT de la mucosa y triptófano hidroxilasa-1 de se ha demostrado que está disminuido en SII-C y SII-D (véase, por ejemplo, Gershon, J. Clin. Gastroenterol., 39 (5 Supl.): S184-193 (2005)). Además, los pacientes con SII-E muestran una deteriorada liberación de 5-HT postprandial, mientras que los pacientes con SII-PI tienen altos niveles de pico de 5-HT (véase, por ejemplo, Dunlop, Clin Gastroenterol Hepatol., 3: 349-357 (2005)).

VII. Ensayos

Cualquiera de los ensayos, técnicas y equipos conocidos en la técnica se puede utilizar para determinar la presencia o el nivel de uno o más marcadores en una muestra para clasificar si la muestra está asociada con SII.

El método descrito se basa, en parte, en la determinación de la presencia o nivel de al menos un marcador en una muestra obtenida de un individuo. Tal como se utiliza aquí, el término "determinar la presencia de al menos un marcador" incluye la determinación de la presencia de cada marcador de interés mediante el uso de cualquier ensayo cuantitativo o cualitativo conocido para un experto en la técnica. En ciertos casos, los ensayos cualitativos que determinan la presencia o ausencia de un rasgo en particular, variable, o sustancia bioquímica o serológica (por ejemplo, la proteína o el anticuerpo) son adecuados para la detección de cada marcador de interés. En otros casos, los ensayos cuantitativos que determinan la presencia o ausencia de RNA, proteína, anticuerpo, o actividad son adecuados para la detección de cada marcador de interés. Tal como se utiliza aquí, el término "determinar el nivel de al menos un marcador" incluye determinar el nivel de cada marcador de interés mediante el uso de cualquier ensayo cuantitativo directo o indirecto conocido para un experto en la técnica. En ciertos casos, los ensayos cuantitativos que determinan, por ejemplo, la cantidad relativa o absoluta de RNA, proteína, anticuerpo, o actividad son adecuados para determinar el nivel de cada marcador de interés. Un experto en la técnica apreciará que cualquier ensayo útil para determinar el nivel de un marcador también es útil para determinar la presencia o ausencia del marcador.

Tal como se utiliza aquí, el término "anticuerpo" incluye una población de moléculas de inmunoglobulina, que puede ser policlonal o monoclonal y de cualquier isotipo, o un fragmento inmunológicamente activo de una molécula de inmunoglobulina. Tal fragmento inmunológicamente activo contiene las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras, que constituyen la porción de la molécula de anticuerpo que se une específicamente a un antígeno. Por ejemplo, un fragmento inmunológicamente activo de una molécula de inmunoglobulina conocida en la técnica como Fab, Fab' o F(ab')₂ se incluye en el sentido del término anticuerpo.

La citometría de flujo se puede utilizar para determinar la presencia o el nivel de uno o más marcadores en una muestra. Tales ensayos de citometría de flujo, incluyendo inmunoensayos basados en cuentas, se pueden utilizar para determinar, por ejemplo, los niveles de marcadores de anticuerpos en la misma manera que la descrita para la detección de anticuerpos séricos contra *Candida albicans* y proteínas del VIH (véase, por ejemplo, Bishop y Davis, *J. Immunol. Methods*, 210: 79-87 (1997); McHugh et al., *J. Immunol. Methods*, 116: 213 (1989); Scillian et al., *Blood*, 73: 2041 (1989)).

La tecnología de presentación en fagos para la expresión de un antígeno recombinante específico para un marcador también se puede utilizar para determinar la presencia o el nivel de uno o más marcadores en una muestra. Las partículas de fago que expresan un antígeno específico para, por ejemplo, un marcador de anticuerpo se pueden anclar, si se desea, a una placa de múltiples pocillos usando un anticuerpo tal como un anticuerpo monoclonal anti-fago (Felici et al., "Phage-Displayed Peptides as Tools for Characterization of Human Sera" en Abelson, *Methods in Enzymol.*, 267, San Diego (Ed.): Academic Press, Inc. (1996)).

Una variedad de técnicas de inmunoensayo, incluyendo inmunoensayos competitivos y no competitivos, se puede utilizar para determinar la presencia o el nivel de uno o más marcadores en una muestra (véase, por ejemplo, Self y Cook, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 7: 60-65 (1996)). El término inmunoensayo abarca técnicas que incluyen, sin limitación, inmunoensayos enzimáticos (EIA) como técnica de inmunoensayo multiplicado por enzimas (EMIT), ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA), ELISA de captura de antígeno, ELISA en sándwich, ELISA de captura de anticuerpo IgM (MAC ELISA), e inmunoensayo enzimático de micropartículas (MEIA); inmunoensayos de electroforesis capilar (CEIA); radioinmunoanálisis (RIA); ensayos inmunoradiométricos (IRMA); inmunoensayos de polarización de fluorescencia (FPIA); y los ensayos de quimioluminiscencia (CL). Si se desea, tales inmunoensayos pueden estar automatizados. Los inmunoensayos también se pueden utilizar junto con fluorescencia inducida por láser (véase, por ejemplo, Schmalzing y Nashabeh, *Electrophoresis*, 18: 2184-2193 (1997); Bao, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci.*, 699: 463-480 (1997)). También son adecuados para su uso los inmunoensayos de liposomas, tales como inmunoensayos de liposomas de flujo de inyección e inmunosensores de liposomas, (véase, por ejemplo, Rongen et al., *J. Immunol. Methods*, 204: 105-133 (1997)). Además, son adecuados para su uso los ensayos de nefelometría, en el que la formación de complejos anticuerpo/proteína resulta en el aumento de la dispersión de la luz que se convierte en una señal de proporción de pico como una función de la concentración de marcador. Los ensayos de nefelometría están comercialmente disponibles de Beckman Coulter (Brea, CA; Kit # 449430) y se puede realizar usando un nefelómetro Behring Analyzer (Fink et al., *J. Clin. Chem. Clin. Biol. Chem.*, 27: 261-276 (1989)).

Un ELISA de captura de antígeno puede ser útil para determinar la presencia o el nivel de uno o más marcadores en una muestra. Por ejemplo, en un ELISA de captura de antígeno, un anticuerpo dirigido a un marcador de interés se une a una fase sólida y la muestra se añade de tal manera que el marcador se une al anticuerpo. Después de eliminar mediante lavado las proteínas no unidas, la cantidad de marcador unido puede cuantificarse usando, por ejemplo, un radioinmunoensayo (ver, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988)). Un ELISA en sándwich también puede

ser adecuado para su uso. Por ejemplo, en un ensayo de sándwich de dos anticuerpos, un primer anticuerpo está unido a un soporte sólido, y se permite que el marcador de interés se una al primer anticuerpo. La cantidad de marcador se cuantifica midiendo la cantidad de un segundo anticuerpo que se une al marcador. Los anticuerpos pueden inmovilizarse sobre una variedad de soportes sólidos, tales como partículas de matriz magnéticas o cromatográficas, la superficie de una placa de ensayo (por ejemplo, pocillos de microtitulación), piezas de un material de sustrato sólido o membrana (por ejemplo, plástico, nylon, papel), y similares. Una tira de ensayo se puede preparar recubriendo con un anticuerpo o una pluralidad de anticuerpos un chip sobre un soporte sólido. Esta tira puede entonces sumergirse en la muestra de ensayo y se procesa rápidamente a través de pasos de lavado y de detección para generar una señal medible, tal como una mancha de color.

Un radioinmunoensayo que utiliza, por ejemplo, un anticuerpo secundario marcado con yodo-125 (^{125}I) (Harlow y Lane, supra) también es adecuado para determinar la presencia o el nivel de uno o más marcadores en una muestra. Un anticuerpo secundario marcado con un marcador quimioluminiscente también puede ser adecuado para su uso. Un ensayo de quimioluminiscencia usando un anticuerpo secundario quimioluminiscente es adecuado para la detección sensible, no radiactiva de los niveles de marcadores. Tales anticuerpos secundarios se pueden obtener comercialmente de varias fuentes, por ejemplo, Amersham Lifesciences, Inc. (Arlington Heights, IL).

Los inmunoensayos descritos anteriormente son particularmente útiles para determinar la presencia o el nivel de uno o más marcadores en una muestra. Como un ejemplo no limitativo, un ELISA usando una molécula de unión de IL-8 tal como un anticuerpo contra IL-8 o una proteína de unión a IL-8 extracelular (por ejemplo, receptor de IL-8) es útil para determinar si una muestra es positiva para la proteína IL-8 o para la determinación de niveles de proteína IL-8 en una muestra. Un ELISA de neutrófilos fijados es útil para determinar si una muestra es positiva para ANCA o para determinar los niveles de ANCA en una muestra. Del mismo modo, un ELISA que utiliza fosfopeptidomano de pared celular de levadura es útil para determinar si una muestra es positiva para ASCA-IgA y/o ASCA-IgG, o para determinar los niveles de ASCA-IgA y/o IgG-ASCA en una muestra. Un ELISA que utiliza proteína OmpC o un fragmento de la misma es útil para determinar si una muestra es positiva para anticuerpos anti-OmpC, o para la determinación de los niveles de anticuerpos anti-OmpC en una muestra. Un ELISA que utiliza proteína I2 o un fragmento de la misma es útil para determinar si una muestra es positiva para anticuerpos anti-I2, o para determinar los niveles de anticuerpos anti-I2 en una muestra. Un ELISA que utiliza proteína flagelina (por ejemplo, la flagelina Cbir-1) o un fragmento de la misma es útil para determinar si una muestra es positiva para anticuerpos anti-flagelina, o para determinar los niveles de anticuerpos anti-flagelina en una muestra. Además, los inmunoensayos descritos anteriormente son particularmente útiles para determinar la presencia o nivel de otros marcadores de diagnóstico en una muestra.

La unión inmunológica específica del anticuerpo al marcador de interés se puede detectar directa o indirectamente. Los marcajes directos incluyen marcajes fluorescentes o luminiscentes, metales, colorantes, radionúclidos, y similares, unidos al anticuerpo. Un anticuerpo marcado con yodo-125 (^{125}I) se puede utilizar para determinar los niveles de uno o más marcadores en una muestra. Un ensayo de quimioluminiscencia utilizando un anticuerpo quimioluminiscente específico para el marcador es adecuado para la detección sensible, no radiactiva de los niveles de marcadores. Un anticuerpo marcado con fluorocromo también es adecuado para determinar los niveles de uno o más marcadores en una muestra. Ejemplos de fluorocromos incluyen, sin limitación, DAPI, fluoresceína, Hoechst 33258, R-ficocianina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, rodamina, rojo Texas, y lisamina. Los anticuerpos secundarios ligados a fluorocromos se pueden obtener comercialmente, por ejemplo, F(ab')₂ de cabra anti-IgG FITC humano está disponible de Tago Immunologicals (Burlingame, CA).

Los marcajes indirectos incluyen diversas enzimas bien conocidas en la técnica, tales como la peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP), β -galactosidasa, ureasa, y similares. Un sistema de detección de peroxidasa de rábano picante se puede utilizar, por ejemplo, con el sustrato cromogénico tetrametilbenzidina (TMB), que produce un producto soluble en presencia de peróxido de hidrógeno que es detectable a 450 nm. Un sistema de detección de fosfatasa alcalina se puede utilizar, por ejemplo, con el sustrato cromogénico p-nitrofenil fosfato, que produce un producto soluble fácilmente detectable a 405 nm. Del mismo modo, un sistema de detección de β -galactosidasa se puede utilizar con el sustrato cromogénico o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), que produce un producto soluble detectable a 410 nm. Un sistema de detección de ureasa se puede utilizar con un sustrato tal como urea-púrpura de bromocresol (Sigma Immunochemicals; St. Louis, MO). Un anticuerpo secundario útil ligado a una enzima se puede obtener a partir de varias fuentes comerciales, por ejemplo, F(ab')₂ de cabra anti-IgG-fosfatasa alcalina humano se pueden comprar a partir de Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA.).

Una señal del marcaje directo o indirecto se puede analizar, por ejemplo, utilizando un espectrofotómetro para detectar el color de un sustrato cromogénico; un contador de radiación para detectar la radiación tal como un contador gamma para la detección de ^{125}I ; o un fluorómetro para detectar la fluorescencia en presencia de luz de una determinada longitud de onda. Para la detección de anticuerpos unidos a enzimas, un análisis cuantitativo de la cantidad de niveles de los marcadores se puede hacer utilizando un espectrofotómetro tal como un lector de microplacas EMAX (Molecular Devices; Menlo Park, CA) de acuerdo con las instrucciones del

fabricante. Si se desea, los ensayos pueden ser automatizados o realizados robóticamente, y puede detectarse simultáneamente la señal a partir de múltiples muestras.

El Western Blot cuantitativo también se puede utilizar para detectar o determinar la presencia o el nivel de uno o más marcadores en una muestra. Los Western blots se pueden cuantificar por métodos bien conocidos tales como densitometría de barrido o imágenes con fósforo. Como un ejemplo no limitativo, las muestras de proteínas se someten a electroforesis en geles Laemmli SDS-PAGE al 10%. Los anticuerpos monoclonales primarios murinos se hacen reaccionar con la mancha, y la linealidad de unión del anticuerpo puede confirmarse usando un experimento preliminar slot blot. Los anticuerpos de cabra acoplados a peroxidasa de rábano picante anti-ratón (BioRad) se utilizan como anticuerpo secundario, y se detecta la señal utilizando quimioluminiscencia, por ejemplo, con el equipo de quimioluminiscencia Renaissance (New England Nuclear; Boston, MA) según las instrucciones del fabricante. Las autorradiografías de las transferencias se analizaron mediante un densitómetro de barrido (Molecular Dynamics; Sunnyvale, CA) y se normalizaron con un control positivo. Los valores se expresan, por ejemplo, como una relación entre el valor real con el control positivo (índice densitométrico). Tales métodos son bien conocidos en la técnica como se describe, por ejemplo, en Parra et al., J. Vasc. Surg., 28: 669-675 (1998).

Alternativamente, pueden utilizarse una variedad de técnicas de ensayo de inmunohistoquímica para determinar la presencia o el nivel de uno o más marcadores en una muestra. El término ensayo inmunohistoquímico abarca técnicas que utilizan la detección visual de las tinciones fluorescentes o enzimas acopladas (es decir, conjugadas) a los anticuerpos que reaccionan con el marcador de interés utilizando microscopía de fluorescencia o microscopía óptica e incluye, sin limitación, ensayo de inmunofluorescencia directa, ensayo indirecto de anticuerpos fluorescentes (IFA), inmunofluorescencia anticomplemento, inmunofluorescencia avidina-biotina, y ensayos de inmunoperoxidasa. Un ensayo IFA, por ejemplo, es útil para determinar si una muestra es positiva para ANCA, para determinar el nivel de ANCA en una muestra, determinar si una muestra es positiva para pANCA, determinar el nivel de pANCA en una muestra, y/o determinar un patrón de tinción de ANCA (por ejemplo, patrón de tinción cANCA, pANCA, NSNA, y/o SAPPa). La concentración de ANCA en una muestra puede cuantificarse, por ejemplo, a través de la medición de la titulación final o por medio de la medición de la intensidad de la fluorescencia visual en comparación con un patrón de referencia conocido.

Alternativamente, la presencia o nivel de un marcador de interés se puede determinar mediante la detección o cuantificación de la cantidad del marcador purificado. La purificación del marcador se puede lograr, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), solo o en combinación con espectrometría de masas (por ejemplo, MALDI/MS, MALDI-TOF/MS, SELDI-TOF/MS, tandem MS, etc.). La detección cualitativa o cuantitativa de un marcador de interés también se puede determinar por métodos bien conocidos incluyendo, sin limitación, ensayos de Bradford, tinción azul de Coomassie, tinción de plata, los ensayos para proteína radiomarcada, y espectrometría de masas.

El análisis de una pluralidad de marcadores puede llevarse a cabo por separado o simultáneamente con una muestra de ensayo. Para el ensayo de los marcadores separado o secuencial, aparatos adecuados incluyen analizadores de laboratorio clínicos tales como los sistemas de inmunoensayo Elecsys (Roche), AxSym (Abbott), Access (Beckman), ADVIA®, CENTAUR® (Bayer), y el NICHOLS ADVANTAGE® (Nichols Institute). Los aparatos preferidos o chips de proteínas, realizan ensayos simultáneos de una pluralidad de marcadores en una sola superficie. Particularmente los formatos físicos útiles comprenden superficies que tienen una pluralidad de posiciones discretas, direccionables para la detección de una pluralidad de diferentes marcadores. Tales formatos incluyen microarrays de proteínas, o "chips de proteínas" (véase, por ejemplo, Ng et al., J. Cell. Mol. Med., 6: 329-340 (2002)) y ciertos dispositivos capilares (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 6.019.944). Cada ubicación de superficie discreta puede comprender anticuerpos para inmovilizar uno o más marcadores para la detección en cada ubicación. Las superficies pueden comprender alternativamente una o más partículas discretas (por ejemplo, micropartículas o nanopartículas) inmovilizadas en localizaciones discretas de una superficie, donde las micropartículas comprenden anticuerpos para inmovilizar uno o más marcadores para la detección.

Además de los ensayos descritos anteriormente para determinar la presencia o el nivel de diversos marcadores de interés, también se describe el análisis de los niveles de mRNA de marcadores utilizando técnicas de rutina, tales como análisis de Northern, reacción en cadena de la polimerasa mediante transcriptasa inversa (RT-PCR), o cualquier otro método basado en la hibridación a una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una porción de la secuencia de codificación de marcador (por ejemplo, la hibridación slot blot). Las técnicas aplicables de amplificación de PCR se describen en, por ejemplo, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. Nueva York (1999), Capítulo 7 y el Suplemento 47.; Teophilus et al., "PCR Mutation Detection Protocols", Humana Press, (2002); y Innis et al., PCR Protocols, San Diego, Academic Press, Inc. (1990). Los métodos de hibridación de ácidos nucleicos generales se describen en Anderson, "Nucleic Acid Hybridization", BIOS Scientific Publishers, 1999. La amplificación o hibridación de una pluralidad de secuencias de ácido nucleico transcritas (por ejemplo, RNAm o DNAc) también se puede realizar a partir de secuencias de RNAm o de DNAc dispuestas en un microarray. Los métodos de microarray se describen generalmente en Hardiman, "Microarrays Methods and Applications: Nuts & Bolts" DNA Press, 2003; y Baldi et

al.," DNA Microarrays and Gene Expression: From Experiments to Data Analysis and Modeling", Cambridge University Press, 2002.

El análisis del genotipo de un marcador tal como un marcador genético puede realizarse usando técnicas conocidas en la técnica, incluyendo, sin limitación, análisis basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), análisis de secuencias, análisis electroforético árido. Un ejemplo no limitante de un análisis basado en PCR incluye un ensayo de discriminación alélica Taqman® disponible de Applied Biosystems. Los ejemplos no limitantes de análisis de secuencias incluyen la secuenciación de Maxam-Gilbert, secuenciación Sanger, secuenciación de DNA de matriz capilar, secuenciación de ciclo térmico (Sears et al., *Biotechniques*, 13: 626-633 (1992)), la secuenciación en fase sólida (Zimmerman et al., *Methods Mol. Biol. Cell*, 3: 39-42 (1992)), la secuenciación con espectrometría de masas tales como espectrometría de masas de tiempo de vuelo por ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF/MS; Fu et al., *Nature Biotech*, 16: 381-384 (1998)), y la secuenciación por hibridación (Chee et al., *Science*, 274: 610-614 (1996); Drmanac et al., *Science*, 260: 1649-1652 (1993); Drmanac et al., *Nature Biotech*, 16: 54-58 (1998)). Los ejemplos no limitantes de análisis electroforético incluyen electroforesis en gel en bloque tal como electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, electroforesis capilar y electroforesis desnaturalizante en gradiente de gel. Otros métodos para determinar el genotipo de un individuo en un sitio polimórfico en un marcador incluyen, por ejemplo, el ensayo INVADER® de Third Wave Technologies, Inc., el análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), la hibridación de oligonucleótidos específico de alelo, un ensayo de movilidad de heterodúplex, y el polimorfismo conformacional de cadena única (SSCP).

Varios marcadores de interés se pueden combinar en una sola prueba para el procesamiento eficaz de múltiples muestras. Además, un experto en la técnica reconocería el valor analizar múltiples muestras (por ejemplo, en puntos de tiempo sucesivos, etc.) del mismo sujeto. Este tipo de pruebas de muestras en serie puede permitir la identificación de los cambios en los niveles del marcador en el tiempo. Los aumentos o disminuciones en los niveles de los marcadores, así como la ausencia de cambio en los niveles de marcadores, también pueden proporcionar información útil para clasificar el SII o para descartar enfermedades y trastornos asociados con síntomas similares al SII.

Un panel para la medición de uno o más de los marcadores descritos anteriormente puede construirse para proporcionar información relevante relacionada con el enfoque para clasificar una muestra por estar asociada con el SII. Un panel de este tipo puede construirse para determinar la presencia o nivel de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, o más marcadores individuales. El análisis de un único marcador o subconjuntos de marcadores también puede llevarse a cabo por un experto en la técnica en diversos entornos clínicos. Estos incluyen, pero no se limitan a, atención ambulatoria urgente, cuidados intensivos, terapia intensiva, unidad de supervisión, consulta hospitalaria, consulta ambulatoria, consultorio médico, clínica médica, y chequeos de salud.

El análisis de marcadores podría llevarse a cabo en una variedad de formatos físicos. Por ejemplo, el uso de placas de microtitulación o la automatización podría utilizarse para facilitar el procesamiento de grandes cantidades de muestras de ensayo. Alternativamente, podrían desarrollarse formatos de muestras individuales para facilitar el tratamiento y el diagnóstico de forma rápida.

VIII. Algoritmos estadísticos

En algunos aspectos, se describen los métodos, sistemas, y el código para clasificar si una muestra está asociada con el SII mediante un algoritmo estadístico o proceso para clasificar la muestra como una muestra con SII o muestra sin SII. En otros aspectos, se describen los métodos, sistemas, y el código para clasificar si una muestra está asociada con el SII usando un primer algoritmo estadístico o proceso para clasificar si la muestra como una muestra sin EII o una muestra con EII (es decir, el paso de descarte de la EII), seguido por un segundo algoritmo estadístico o proceso para clasificar la muestra sin EII como una muestra con SII o sin SII (es decir, el paso confirmación del SII). Preferiblemente, los algoritmos o procesos estadísticos comprenden independientemente uno o más sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje. Como se describe aquí, una combinación de sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje proporcionan ventajosamente una mejora de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo, valor predictivo positivo y/o precisión global para clasificar si una muestra está asociada con SII.

El término "algoritmo estadístico" o "proceso estadístico" incluye cualquiera de una variedad de análisis estadísticos utilizados para determinar las relaciones entre las variables. Las variables pueden ser la presencia o nivel de al menos un marcador de interés y/o la presencia o la gravedad de al menos un síntoma relacionado con el SII. Cualquier número de marcadores y/o síntomas puede ser analizado usando un algoritmo estadístico descrito en el presente documento. Por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, o más biomarcadores y/o síntomas pueden ser incluidos en un algoritmo estadístico. Se puede utilizar la regresión logística. Alternativamente se puede usar la regresión lineal. En ciertos casos, los algoritmos estadísticos pueden utilizar una medición cuantil de un marcador particular dentro de una población determinada como una variable. Los cuantiles son un conjunto de "puntos de corte" que

dividen a una muestra de datos en grupos que contienen (en lo posible) el mismo número de observaciones. Por ejemplo, los cuartiles son valores que dividen una muestra de datos en cuatro grupos que contienen (en lo posible) el mismo número de observaciones. El cuartil inferior es el valor de los datos inferiores de una cuarta parte de la serie de datos ordenada; el cuartil superior es el valor de los datos superiores de una cuarta parte del conjunto de datos ordenados. Los quintiles son valores que dividen una muestra de datos en cinco grupos que contienen (en lo posible) el mismo número de observaciones. El método descrito también puede incluir el uso de rangos de percentiles de los niveles de marcadores (por ejemplo, terciles, cuartiles, quintiles, etc.), o sus índices acumulados (por ejemplo, sumas de cuartiles de niveles de los marcadores, etc.) como variables en los algoritmos (al igual que con las variables continuas).

Los algoritmos estadísticos pueden comprender uno o más sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje. Tal como se utiliza aquí, el término "sistema clasificador estadístico de aprendizaje" incluye una máquina de aprendizaje de la técnica algorítmica capaz de adaptarse a los conjuntos de datos complejos (por ejemplo, el panel de marcadores de interés y/o lista de síntomas relacionados con el SII) y la toma de decisiones sobre la base de estos juegos de datos. Se puede utilizar un único sistema clasificador estadístico de aprendizaje tal como un árbol de clasificación (por ejemplo, bosque aleatorio). También se pueden utilizar una combinación de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje adicionales, preferentemente en tándem. Ejemplos de sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje incluyen, pero no se limitan a, los que utilizan el aprendizaje inductivo (por ejemplo, árboles de decisión/clasificación, como los bosques al azar, árboles de clasificación y de regresión (C&RT), árboles de decisión, etc.), aprendizaje correcto aproximadamente probable (PAC), aprendizaje conexionista (por ejemplo, las redes neuronales (NN), redes neuronales artificiales (RNA), redes neuro difusas (NFN), estructuras de redes, perceptrones como perceptrones multicapa, redes de alimentación directa de múltiples capas, aplicaciones de redes neuronales, aprendizaje bayesiano en las redes de creencias, etc.), aprendizaje por refuerzo (por ejemplo, el aprendizaje pasivo en un entorno conocido como el aprendizaje ingenuo, aprendizaje dinámico de adaptación y aprendizaje de diferencia temporal, aprendizaje pasivo en un entorno desconocido, el aprendizaje activo en un entorno desconocido, el aprendizaje de funciones de acción y de valor, las aplicaciones de aprendizaje por refuerzo, etc.), y los algoritmos genéticos y de programación evolutiva. Otros sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje incluyen máquinas de vectores soporte (por ejemplo, métodos Kernel), *spline* de regresión multiadaptativa (MARS), algoritmos de Levenberg-Marquardt, algoritmos de Gauss-Newton, mezclas gaussianas, algoritmos de descenso por gradiente, aprendizaje por cuantificación vectorial (LVQ).

Los bosques aleatorios son sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje que se construyen utilizando un algoritmo desarrollado por Leo Breiman y Adele Cutler. Los bosques aleatorios utilizan un gran número de árboles de decisión individuales y deciden la clase eligiendo el modo de las clases (es decir, las que se producen con más frecuencia) según se ha determinado mediante árboles individuales. El análisis de bosque aleatorio se puede realizar, por ejemplo, utilizando el programa RandomForests disponible de Salford Systems (San Diego, CA). Véase, por ejemplo, Breiman, Machine Learning, 45: 5-32 (2001); y http://stat-www.berkeley.edu/users/breiman/Random-Forests/cc_home.htm, para una descripción de los bosques aleatorios.

Los árboles de regresión y clasificación representan una alternativa intensiva computerizada para modelos de regresión clásica de ajuste y se usan normalmente para determinar el mejor modelo posible para una respuesta categórica o continua de interés sobre la base de uno o más predictores. El análisis del árbol de regresión y clasificación se puede realizar, por ejemplo, utilizando el programa CART disponible de Salford Systems o el programa de análisis de datos Statistica disponible de Statsoft, Inc. (Tulsa, OK). Una descripción de los árboles de regresión y clasificación encuentra, por ejemplo, en Breiman et al. "Classification and Regression Trees," Chapman y Hall, Nueva York (1984); y Steinberg et al., "CART: Tree-Structured Non-Parametric Data Analysis". Salford Systems, San Diego, (1995).

Las redes neuronales son grupos interconectados de neuronas artificiales que utilizan un modelo matemático o computacional para el procesamiento de la información basada en un enfoque conexionista a la computación. Normalmente, las redes neuronales son sistemas adaptativos que cambian su estructura en base a información externa o interna que fluye a través de la red. Los ejemplos específicos de las redes neuronales incluyen redes neuronales alimentadas hacia delante como perceptrones, perceptrones de una sola capa, perceptrones multicapa, redes de retropropagación, redes Adaline, redes Madeline, redes Leammatrix, redes de función de base radial (RBF), y los mapas auto-organizados o redes Kohonen auto-organizadas; redes neuronales recurrentes como las redes recurrentes simples y redes de Hopfield; redes neuronales estocásticas tales como máquinas de Boltzmann; redes neuronales modulares como comité de máquinas y redes neuronales asociativas; y otros tipos de redes, tales como redes neuronales entrenadas instantáneamente, redes neuronales de impulsos, redes neuronales dinámicas, y redes neuronales en cascada. El análisis de redes neuronales se puede realizar, por ejemplo, utilizando el programa de análisis de datos Statistica disponible de Statsoft, Inc. Para una descripción de las redes neuronales véase, por ejemplo, Freeman et al., en "Neural Networks: Algorithms, Applications and Programming Techniques". Addison-Wesley Publishing Company (1991); Zadeh, Information and Control, 8: 338-353 (1965); Zadeh. "IEEE Trans. on Systems, Man and Cybernetics," 3: 28-44 (1973); Gersho et al., en "Vector Quantization and Signal

Compression," Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, Londres (1992); y Hassoun, " Fundamentals of Artificial Neural Networks", MIT Press, Cambridge, Massachusetts, Londres (1995).

Las máquinas de vectores de soporte son un conjunto de técnicas de aprendizaje supervisado relacionadas que se utilizan para la clasificación y la regresión y se describen, por ejemplo, en Cristianini et al., "An Introduction to Support Vector Machines and Other Kernel-Based Learning Methods", Cambridge University Press (2000). El análisis de las máquinas de vectores de soporte se puede realizar, por ejemplo, utilizando el programa SVM^{light} desarrollado por Thorsten Joachims (Universidad de Cornell) o utilizar el programa LIVSVM desarrollado por Chih-Chung Chang y Chih-Jen Lin (Universidad Nacional de Taiwán).

Los sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje descritos en este documento pueden entrenarse y probarse en una cohorte de muestras (por ejemplo, muestras serológicas) de individuos sanos, pacientes con SII, pacientes con EII, y/o pacientes con enfermedad celíaca. Por ejemplo, las muestras de pacientes diagnosticados por un médico, y preferiblemente por un gastroenterólogo que tienen EII utilizando una biopsia, colonoscopia, o un inmunoensayo como se describe en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.218.129, son adecuados para su uso en el entrenamiento y prueba de los sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje. Las muestras de pacientes diagnosticados de EII también pueden ser estratificados en la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa usando un inmunoensayo como se describe en, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.750.355 y 5.830.675. Las muestras de pacientes diagnosticados con SII utilizando un criterio publicado como el criterio de diagnóstico de Manning, Roma I, Roma II, o Roma III son adecuados para su uso en el entrenamiento y prueba de los sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje. Las muestras de individuos sanos pueden incluir aquellas que no fueron identificadas como EII y/o muestras de SII. Un experto en la técnica conocerá técnicas adicionales y criterios de diagnóstico para la obtención de una cohorte de muestras de pacientes que se puede utilizar en el entrenamiento y pruebas de los sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje.

Tal como se utiliza aquí, el término "sensibilidad" se refiere a la probabilidad de que un método de diagnóstico, sistema o código dé un resultado positivo cuando la muestra es positiva, por ejemplo, que tiene SII. La sensibilidad se calcula como el número de resultados positivos verdaderos dividido por la suma de los verdaderos positivos y falsos negativos. La sensibilidad en esencia es una medida de lo bueno que es un método, sistema o código identificando correctamente las personas con SII de aquellas sin la enfermedad. Los algoritmos estadísticos se pueden seleccionar de tal manera que la sensibilidad de la clasificación del SII es al menos aproximadamente un 60%, y pueden ser, por ejemplo, al menos aproximadamente un 65%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98%, o 99%. La sensibilidad de la clasificación del SII puede ser al menos aproximadamente del 90% cuando se usa una combinación de sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje (véase, Ejemplo 10) o al menos aproximadamente del 85% cuando se usa un sistema clasificador estadístico de aprendizaje único (véase el Ejemplo 11).

El término "especificidad" se refiere a la probabilidad de que un método de diagnóstico, sistema, o código dé un resultado negativo cuando la muestra no es positiva, por ejemplo, no tiene SII. La especificidad se calcula como el número de resultados negativos verdaderos dividido por la suma de los verdaderos negativos y falsos positivos. La especificidad esencialmente es una medida de lo bueno que es un método, sistema o código excluyendo a aquellos que no tienen SII de aquellos que tienen la enfermedad. Los algoritmos estadísticos se pueden seleccionar de tal manera que la especificidad de la clasificación del SII es al menos aproximadamente un 70%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%. La especificidad de la clasificación del SII puede ser al menos aproximadamente del 86% cuando se usa una combinación de sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje (véase, Ejemplo 10) o al menos aproximadamente del 84% cuando se usa un sistema clasificador estadístico de aprendizaje único (véase el Ejemplo 11).

Tal como se utiliza aquí, el término "valor predictivo negativo" o "VPN" se refiere a la probabilidad de que un individuo identificado por no tener SII realmente no tenga la enfermedad. El valor predictivo negativo puede calcularse como el número de verdaderos negativos dividido por la suma de los verdaderos negativos y falsos negativos. El valor predictivo negativo se determina por las características del método de diagnóstico, sistema, o código, así como la prevalencia de la enfermedad en la población analizada. Los algoritmos estadísticos se pueden seleccionar de tal manera que el valor predictivo negativo en una población que tiene una prevalencia de la enfermedad esté en el intervalo de aproximadamente del 70% a aproximadamente el 99% y puede ser, por ejemplo, al menos aproximadamente del 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93% , 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%. El valor predictivo negativo para clasificar el SII puede ser al menos aproximadamente del 87% cuando se usa una combinación de sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje (véase, Ejemplo 10).

El término "valor predictivo positivo" o "VPP" se refiere a la probabilidad de que un individuo identificado con SII tenga realmente la enfermedad. El valor predictivo positivo se puede calcular como el número de verdaderos positivos, dividido por la suma de los verdaderos positivos y falsos positivos. El valor predictivo positivo se

determina por las características del método de diagnóstico, sistema, o código, así como la prevalencia de la enfermedad en la población analizada. Los algoritmos estadísticos se pueden seleccionar de tal manera que el valor predictivo positivo en una población que tiene una prevalencia de la enfermedad este en el intervalo de aproximadamente del 80% a aproximadamente el 99% y puede ser, por ejemplo, al menos aproximadamente del 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%. El valor predictivo positivo para clasificar el SII puede ser al menos aproximadamente del 90% cuando se usa una combinación de sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje (véase, Ejemplo 10).

Los valores predictivos, incluidos los valores predictivos positivos y negativos, se ven influidos por la prevalencia de la enfermedad en la población analizada. En los métodos, sistemas, y el código, los algoritmos estadísticos se pueden seleccionar para producir un parámetro clínico deseado para una población clínica con una prevalencia de SII particular. Por ejemplo, los sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje pueden seleccionarse para una prevalencia de SII de hasta aproximadamente el 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, o 70%, que se puede ver, por ejemplo, en un consultorio médico, como en la consulta de un gastroenterólogo o de un médico de medicina general.

Tal como se utiliza aquí, el término "acuerdo global" o "precisión global" se refiere a la precisión con la que un método, sistema o código clasifica un estado de enfermedad. La precisión global se calcula como la suma de los verdaderos positivos y verdaderos negativos dividida por el número total de resultados de la muestra y se ve afectada por la prevalencia de la enfermedad en la población analizada. Por ejemplo, los algoritmos estadísticos se pueden seleccionar de tal manera que la precisión global en una población paciente que tiene una prevalencia de la enfermedad es al menos aproximadamente del 60%, y puede ser, por ejemplo, al menos aproximadamente del 65%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93 %, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%. La precisión global para clasificar el SII puede ser al menos aproximadamente del 80% cuando se usa una combinación de sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje (véase, Ejemplo 10).

IX. Sistema de clasificación de enfermedades

La figura 2 ilustra un sistema de clasificación de enfermedades (SCE) (200). Como se muestra en la misma, un SCE incluye un módulo de inteligencia de SCE (205), tal como un ordenador, que tiene un procesador (215) y el módulo de memoria (210). El módulo de inteligencia también incluye módulos de comunicación (no mostrados) para transmitir y recibir información a través de una o más conexiones directas (por ejemplo, USB, Firewire, u otra interfaz) y una o más conexiones de red (por ejemplo, incluyendo un módem u otro dispositivo de interfaz de red). El módulo de memoria puede incluir dispositivos de memoria internos y uno o más dispositivos de memoria externos. El módulo de inteligencia también incluye un módulo de pantalla (225), tal como un monitor o una impresora. En un aspecto, el módulo de inteligencia recibe datos tales como resultados de la prueba de pacientes de un módulo de adquisición de datos tales como un sistema de prueba (250), ya sea a través de una conexión directa o través de una red (240). Por ejemplo, el sistema de prueba puede estar configurado para ejecutar las pruebas de varios analitos en una o más muestras de pacientes (255) y automáticamente proporcionar los resultados de la prueba al módulo de inteligencia. Los datos también se pueden proporcionar al módulo de inteligencia a través de la entrada directa por un usuario o puede descargarse desde un medio portátil como un disco compacto (CD) o un disco versátil digital (DVD). El sistema de prueba puede estar integrado con el módulo de inteligencia, directamente acoplado al módulo de inteligencia, o puede estar acoplado a distancia con el módulo de inteligencia en red. El módulo de inteligencia también puede comunicar datos hacia y desde uno o más sistemas clientes (230) a través de la red, como es bien conocido. Por ejemplo, un médico o proveedor de atención médica solicitante que puede ser residente en un laboratorio o en el hospital, podrá obtener y ver un informe del módulo de inteligencia, usando un sistema cliente (230).

La red puede ser una LAN (red de área local), WAN (red de área amplia), red inalámbrica, red de punto a punto, red en estrella, red en anillo, concentrador de red, u otra configuración. Ya que el tipo más común de red en uso actual es una red TCP/IP (Protocolo de control de transferencia y Protocolo de internet), tales como la interconexión de redes mundiales a menudo se refiere como "Internet" con la "I" mayúscula, que será utilizado en muchos de los ejemplos del presente documento, pero se debe entender que las redes que el método descrito puede utilizar no son tan limitados, aunque TCP/IP es el protocolo preferido en la actualidad.

Varios elementos en el sistema mostrado en la Figura 2 pueden incluir elementos convencionales, bien conocidos que no necesitan ser explicados en detalle aquí. Por ejemplo, el módulo de inteligencia podría ser implementado como un ordenador personal de escritorio, estaciones de trabajo, unidad central, ordenador portátil, etc. Cada sistema cliente podría incluir un ordenador personal de escritorio, estación de trabajo, ordenador portátil, PDA, teléfono móvil, o cualquier dispositivo WAP o cualquier otro dispositivo capaz de interactuar directa o indirectamente con Internet u otra conexión de red informática. Un sistema cliente ejecuta normalmente un cliente HTTP, por ejemplo, un programa de navegación, tales como el navegador de Microsoft Internet Explorer, el navegador Navigator™ de Netscape, el navegador Opera, o un navegador WAP en el caso de un teléfono móvil, PDA o cualquier otro dispositivo inalámbrico, o similares, que permiten a un usuario del sistema cliente acceder, procesar, y visualizar la información y las páginas a su disposición desde el módulo de

inteligencia en la red. Cada sistema de cliente también incluye normalmente uno o más dispositivos de interfaz de usuario, tales como un teclado, un ratón, pantalla táctil, lápiz o similar, para interactuar con una interfaz gráfica de usuario (GUI) proporcionada por el navegador en una pantalla (por ejemplo, el monitor pantalla, pantalla LCD, etc.) (235), en relación con las páginas, formularios, y otra información proporcionada por el módulo de inteligencia. Como se discutió anteriormente, el método descrito es adecuado para su uso con Internet, que se refiere a una interconexión de redes mundial específico de las redes. Sin embargo, debe entenderse que otras redes pueden utilizarse en lugar de Internet, tales como una intranet, una extranet, una red privada virtual (VPN), una red no basada en TCP / IP, cualquier LAN o WAN, o similares.

Cada sistema cliente y todos sus componentes pueden configurarse por el operador utilizando aplicaciones, como un navegador, incluyendo el código de ejecución de la computadora mediante una unidad central de procesamiento, como un procesador Intel® Pentium® o similares. Del mismo modo, el módulo de inteligencia y todos sus componentes podrían configurarse por el operador utilizando aplicaciones que incluyendo el código de ejecución de la computadora mediante una unidad de procesamiento central (215), como un procesador Intel Pentium o similar, o múltiples unidades de procesador. El código informático para el funcionamiento y la configuración del módulo de inteligencia para procesar los datos y resultados de la prueba como se describe aquí se descarga y almacena preferiblemente en un disco duro, pero todo el código de programa, o porciones de los mismos, también se pueden almacenar en cualquier otro dispositivo o medio de memoria volátil o no volátil como es bien conocido, tal ROM o RAM, o proporcionado en cualquier medio legible por otro ordenador (260) capaz de almacenar el código del programa, tal como un disco compacto (CD), disco versátil digital (DVD), un disquete, ROM, RAM, y similares.

El código de ordenador para la aplicación de diversos aspectos se pueden implementar en cualquier lenguaje de programación que se pueda ejecutar en un sistema informático, tales como, por ejemplo, en C, C++, C#, HTML, Java, JavaScript, o cualquier otro lenguaje de programación, tales como VBScript. Además, todo el código del programa, o partes del mismo, se puede incluir como una señal portadora, que puede ser transmitida y descargada desde una fuente de programas (por ejemplo, un servidor) a través de Internet, o sobre cualquier otra conexión de red convencional como es bien conocido (por ejemplo, extranet, VPN, LAN, etc.) utilizando cualquier medio de comunicación y protocolos (por ejemplo, TCP/IP, HTTP, HTTPS, Ethernet, etc.), como es bien conocido.

El módulo de inteligencia puede aplicar un proceso de clasificación de enfermedades para analizar los resultados de pruebas de pacientes y/o respuestas al cuestionario para determinar si una muestra de paciente se asocia con el SII. Los datos pueden ser almacenados en una o más tablas de datos u otras estructuras de datos lógicos en la memoria (210) o en un sistema de almacenamiento o base de datos separada, junto con el módulo de inteligencia. Uno o más procesos estadísticos se aplican normalmente a un conjunto de datos que incluye datos de prueba para un paciente particular. Por ejemplo, los datos de prueba pueden incluir un perfil de marcador de diagnóstico, que comprende datos que indican la presencia o nivel de al menos un marcador en una muestra del paciente. Los datos de prueba también pueden incluir un perfil de síntomas, que comprende datos que indican la presencia o la gravedad de al menos un síntoma asociado con el SII que el paciente está experimentando o ha experimentado recientemente. En un aspecto, un proceso estadístico produce una decisión derivada estadísticamente que clasifica la muestra del paciente como una muestra con SII o muestra sin SII basado en el perfil de marcador de diagnóstico y/o el perfil de los síntomas. En otro aspecto, un primer proceso estadístico produce una primera decisión derivada estadísticamente que clasifica la muestra del paciente como una muestra con EII o muestra sin EII basado en el perfil de marcador de diagnóstico y/o el perfil de los síntomas. Si la muestra del paciente se clasifica como una muestra sin EII, un segundo proceso estadístico se aplica al mismo grupo de datos o a un grupo diferente para producir una segunda decisión derivada estadísticamente que clasifica la muestra sin EII como una muestra con SII o muestra sin SII. La primera y/o segunda decisión obtenida por estadística, se puede mostrar en un dispositivo de pantalla asociado o acoplado al módulo de inteligencia, o la decisión se puede proporcionar y mostrarse en un sistema separado, por ejemplo, un sistema cliente (230). Los resultados mostrados permiten a un médico hacer un diagnóstico o pronóstico razonado.

X. Terapia y monitorización terapéutica

Una vez que una muestra de un individuo ha sido clasificada como una muestra con SII, los métodos, sistemas, y el código pueden comprender además la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco útil para el tratamiento de uno o más síntomas asociados con el SII (es decir, un fármaco para SII). Para aplicaciones terapéuticas, el medicamento para el SII se puede administrar solo o co-administrarse en combinación con uno o más fármacos para el SII y/o uno o más fármacos que reducen los efectos secundarios asociados con el fármaco para el SII.

Los medicamentos para el SII pueden administrarse con un excipiente farmacéutico adecuado según sea necesario y pueden llevarse a cabo a través de cualquiera de los modos aceptados de administración. Por lo tanto, la administración puede ser, por ejemplo, intravenosa, tópica, subcutánea, transcutánea, transdérmica, intramuscular, oral, bucal, sublingual, gingival, palatal, intra-articular, parenteral, intra-arteriolar, intradérmica,

intraventricular, intracraneal, intraperitoneal, intralesional, intranasal, rectal, vaginal, o por inhalación. Por "co-administrar" se quiere decir que un fármaco para el SII se administra al mismo tiempo, justo antes, o justo después de la administración de un segundo fármaco (por ejemplo, otro fármaco para el SII, un fármaco útil para reducir los efectos secundarios del fármaco para el SII, etc.).

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco para el SII se pueden administrar en varias ocasiones, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o más veces, o la dosis se puede administrar mediante infusión continua. La dosis puede tomar la forma de un sólido, semisólido, polvo liofilizado, tales como, por ejemplo, comprimidos, píldoras, pellets, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones, emulsiones, supositorios, enemas de retención, cremas, ungüentos, lociones, geles, aerosoles, espumas, o similares, o formas de dosificación líquidas, preferiblemente en formas de dosificación unitaria adecuadas para la administración sencilla de dosis precisas.

Tal como se utiliza aquí, el término "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de un fármaco para el SII calculada para producir el deseado inicio, tolerabilidad y/o efectos terapéuticos, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado (por ejemplo, una ampolla). Además, se pueden preparar formas de dosificación más concentradas, a partir de las cuales se pueden producir entonces las formas de dosificación unitarias más diluidas. Las formas de dosificación más concentradas contendrán por lo tanto sustancialmente más que, por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más veces la cantidad de fármaco para el SII.

Los métodos para preparar tales formas de dosificación son conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)). Las formas de dosificación normalmente incluyen un vehículo o excipiente farmacéutico convencional y pueden incluir adicionalmente otros agentes medicinales, vehículos, adyuvantes, diluyentes, mejoradores de la permeación de los tejidos, solubilizantes, y similares. Excipientes apropiados se pueden adaptar a la forma particular de dosificación y vía de administración por métodos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, supra).

Los ejemplos de excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma de acacia, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, solución salina, jarabe, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, y ácidos poliacrílicos, tales como carbopol, por ejemplo, Carbopol 941, Carbopol 980, Carbopol 981, etc. Las formas de dosificación pueden incluir adicionalmente agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes; agentes de suspensión; agentes conservantes tales como metil-, etil- y propil-hidroxi-benzoatos (es decir, los parabenos); agentes de ajuste del pH tales como ácidos y bases inorgánicos y orgánicos; agentes edulcorantes; y agentes aromatizantes. Las formas de dosificación también pueden comprender perlas biodegradables de polímeros, dextrano, y complejos de inclusión de ciclodextrina.

Para la administración oral, la dosis terapéuticamente eficaz puede ser en forma de comprimidos, cápsulas, emulsiones, suspensiones, soluciones, jarabes, aerosoles, pastillas, polvos y formulaciones de liberación sostenida. Los excipientes adecuados para la administración oral incluyen manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, gelatina, sacarosa, carbonato de magnesio, y similares de calidad farmacéutica.

La dosis terapéuticamente eficaz puede tomar la forma de una píldora, tableta, o cápsula, y por lo tanto, la forma de dosificación puede contener, junto con un fármaco para el SII, cualquiera de los siguientes: un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico, y similares; un disgregante tal como almidón o derivados de los mismos; un lubricante tal como estearato de magnesio y similares; y un aglutinante tal como almidón, goma de acacia, polivinilpirrolidona, gelatina, celulosa y derivados de los mismos. Un fármaco para el SII también se puede formular en un supositorio dispuesto, por ejemplo, en un portador de polietilenglicol (PEG).

Las formas farmacéuticas líquidas se pueden preparar disolviendo o dispersando un fármaco para el SII y opcionalmente uno o más adyuvantes farmacéuticamente aceptables en un vehículo tal como, por ejemplo, solución salina acuosa (por ejemplo, 0,9% p/v de cloruro de sodio), dextrosa acuosa, glicerol, etanol, y similares, para formar una solución o suspensión, por ejemplo, para administración oral, tópica o intravenosa. Un fármaco para el SII también se puede formular en un enema de retención.

Para la administración tópica, la dosis terapéuticamente eficaz puede ser en forma de emulsiones, lociones, geles, espumas, cremas, jaleas, soluciones, suspensiones, ungüentos y parches transdérmicos. Para la administración por inhalación, un fármaco para el SII puede ser entregado como un polvo seco o en forma líquida a través de un nebulizador. Para la administración parenteral, la dosis terapéuticamente eficaz puede estar en forma de soluciones inyectables estériles y polvos envasados estériles. Preferiblemente, las soluciones inyectables se formulan a un pH entre aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,5.

La dosis terapéuticamente eficaz también se puede proporcionar en una forma liofilizada. Tales formas de dosificación pueden incluir un tampón, por ejemplo, bicarbonato, para la reconstitución antes de la administración, o el tampón puede ser incluido en la forma de dosificación liofilizada para la reconstitución con, por ejemplo, agua. La forma de dosificación liofilizada puede comprender además un vasoconstrictor adecuado, por ejemplo, epinefrina. La forma de dosificación liofilizada se puede proporcionar en una jeringa, opcionalmente envasado en combinación con el tampón para la reconstitución, de tal manera que la forma de dosificación reconstituida puede inmediatamente administrar a un individuo.

En el uso terapéutico para el tratamiento de SII, un fármaco para el SII se puede administrar a la dosificación inicial de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg al día. Se puede utilizar un intervalo de dosis diaria de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, desde aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, desde aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, o de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. Las dosificaciones, sin embargo, pueden variarse dependiendo de los requerimientos del individuo, la gravedad de los síntomas del SII, y el fármaco para el SII que se emplea. Por ejemplo, las dosificaciones se pueden determinar empíricamente teniendo en cuenta la gravedad de los síntomas del SII en un individuo clasificado con SII de acuerdo con los métodos descritos en este documento. La dosis administrada a un individuo debe ser suficiente para afectar a una respuesta terapéutica beneficiosa en el individuo a lo largo del tiempo. El tamaño de la dosis también puede determinarse por la existencia, naturaleza y extensión de cualesquiera efectos secundarios adversos que acompañan la administración de un fármaco en particular para el SII, en un individuo. La determinación de la dosificación apropiada para una situación particular está dentro de la habilidad del practicante. Generalmente, el tratamiento se inicia con dosis más pequeñas que son inferiores a la dosis óptima del fármaco para el SII. A partir de entonces, la dosificación se aumenta en pequeños incrementos hasta que se alcanza el efecto óptimo bajo las circunstancias. Por conveniencia, la dosificación diaria total puede dividirse y administrarse en porciones diarias, si se desea.

Tal como se usa en el presente documento, el término "fármaco para el SII" incluye todas las formas farmacéuticamente aceptables de un medicamento que es útil para el tratamiento de uno o más síntomas asociados con el SII. Por ejemplo, el fármaco para el SII puede estar en una mezcla racémica o isomérica, un complejo sólido unido a una resina de intercambio de iones, o similares. Además, el fármaco para el SII puede estar en una forma solvatada. El término "fármaco para el SII" también pretende incluir todas las sales farmacéuticamente aceptables, derivados y análogos del fármaco para el SII que se describe, así como combinaciones de los mismos. Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables de un medicamento para el SII incluyen, sin limitación, el tartrato, succinato, tartarato, bitartarato, diclorhidrato, salicilato, hemisuccinato, citrato, maleato, clorhidrato, carbamato, sulfato, nitrato, benzoato y las formas salinas de los mismos, así como combinaciones de los mismos y similares. Cualquier forma de un fármaco para el SII es adecuada para el uso en los métodos, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable de un fármaco para el SII, una base libre de un fármaco para el SII, o una mezcla de los mismos.

Los fármacos adecuados que son útiles para el tratamiento de uno o más síntomas asociados con el SII incluyen, pero no se limitan a, agentes serotoninérgicos, antidepresivos, activadores del canal de cloruro, bloqueadores del canal de cloruro, agonistas de la guanilato ciclasa, antibióticos, opioides, antagonistas de neuroquinina, agentes antiespasmódicos o anticolinérgicos, alcaloides de belladona, barbitúricos, probióticos, análogos al péptido similar al glucagón 1 (GLP-1), antagonistas del factor liberador de corticotropina (CRF), bases libres de los mismos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, derivados de los mismos, análogos de los mismos, y combinaciones de los mismos. Otros fármacos para el SII incluyen agentes de carga, antagonistas de la dopamina, carminativas, tranquilizantes, dextofisopam, fenitoína, timolol y diltiazem.

Los agentes serotoninérgicos son útiles para el tratamiento de los síntomas del SII tales como estreñimiento, diarrea y/o estreñimiento y diarrea alternando. Los ejemplos no limitantes de agentes serotoninérgicos se describen en Cash et al., Aliment. Pharmacol. Ther., 22: 1047-1060 (2005), e incluyen los agonistas del receptor 5-HT₃ (por ejemplo, MKC-733, etc.), agonistas del receptor 5-HT₄ (por ejemplo, tegaserod (Zelnorm™), prucaloprida, AG1-001, etc.), antagonistas del receptor 5-HT₃ (por ejemplo, alosetrón (Lotronex®), cilansetrón, ondansetrón, granisetrón, dolasetrón, ramosetrón, palonosetrón, E-3620, DDP-225, DDP-733, etc.), mezcla de antagonistas de los receptores 5-HT₃/agonistas de los receptores 5-HT₄ (por ejemplo, cisaprida, mosaprida, renzaprida, etc.), bases libres de los mismos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, derivados de los mismos, análogos de los mismos, y combinaciones de los mismos. Además, se pueden administrar para tratar pacientes con SII aminoácidos como la glutamina y ácido glutámico que regulan la permeabilidad intestinal al afectar la señalización celular neuronal o glial.

Los antidepresivos como el inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (SSRI) o antidepresivos tricíclicos son particularmente útiles para el tratamiento de los síntomas del SII, como dolor abdominal, estreñimiento y/o diarrea. Los ejemplos no limitantes de los antidepresivos SSRI incluyen citalopram, fluvoxamina, paroxetina, fluoxetina, sertralina, bases libres de los mismos, las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, derivados de los mismos, análogos de los mismos, y combinaciones de los mismos. Ejemplos de antidepresivos tricíclicos incluyen, pero no se limitan a, desipramina, nortriptilina, protriptilina, amitriptilina, clomipramina,

doxepina, imipramina, trimipramina, amoxapina, maprotilina, clomipramina, bases libres de los mismos, las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, derivados de los mismos, análogos de los mismos, y sus combinaciones.

Los activadores de los canales de cloruro son útiles para el tratamiento de los síntomas del SII, tales como el estreñimiento. Un ejemplo no limitante de un activador del canal de cloruro es lubiprostona (Amitiza TM), una base libre de la misma, una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, un derivado de la misma, o un análogo de la misma. Además, los bloqueadores del canal de cloruro tales como crofelemer son útiles para el tratamiento de los síntomas del SII como la diarrea. Agonistas de la guanilato ciclase tales como MD-1100 son útiles para el tratamiento del estreñimiento asociado con SII (véase, por ejemplo, Bryant et al., Gastroenterol., 128: A-257 (2005)). Los antibióticos como la neomicina también pueden ser adecuados para su uso en el tratamiento de estreñimiento asociado con SII (véase, por ejemplo, Park et al., Gastroenterol., 128: A-258 (2005)). Los antibióticos no absorbibles como rifaximina (Xifaxan TM) son adecuados para tratar el crecimiento excesivo del intestino delgado y/o estreñimiento bacteriano asociada con SII (véase, por ejemplo, Sharara et al., Am. J. Gastroenterol., 101: 326-333 (2006)).

Los opioides tales como opiáceos kappa (por ejemplo, asimadolina) pueden ser útiles para tratar el dolor y/o estreñimiento asociado con SII. Los antagonistas de la neuroquinina (NK) tales como talnetant, saredutant, y otros antagonistas de NK2 y/o NK3 pueden ser útiles para el tratamiento de los síntomas del SII tales como la hipersensibilidad de los músculos en el colon, estreñimiento y/o diarrea. Agentes antiespasmódicos o anticolinérgicos tales como diciclomina pueden ser útiles para el tratamiento de los síntomas del SII tales como espasmos en los músculos del intestino y la vejiga. Otros agentes antiespasmódicos o anticolinérgicos tales como alcaloides de belladona (por ejemplo, atropina, escopolamina, hiosciamina, etc.) se pueden utilizar en combinación con barbitúricos tales como fenobarbital para reducir los espasmos intestinales asociados con SII. Análogos de GLP-1 tales como GTP-010 pueden ser útiles para el tratamiento de los síntomas del SII tales como el estreñimiento. Los antagonistas de CRF tales como astresina y probióticos tales como VSL#3® pueden ser útiles para el tratamiento de uno o más síntomas de SII. Un experto en la técnica sabrá de fármacos adicionales para el SII actualmente en uso o en desarrollo que son adecuados para el tratamiento de uno o más síntomas asociados con el SII.

Un individuo puede también ser monitorizado en intervalos de tiempo periódicos para evaluar la eficacia de un determinado régimen terapéutico una vez que una muestra del individuo ha sido clasificada como una muestra con SII. Por ejemplo, los niveles de ciertos marcadores cambian según el efecto terapéutico de un tratamiento tal como un fármaco. El paciente se monitoriza para evaluar la respuesta y comprender los efectos de ciertos medicamentos o tratamientos en un enfoque individualizado. Además, los pacientes pueden no responder a un fármaco, pero los marcadores pueden cambiar, lo que sugiere que estos pacientes pertenecen a una población especial (no sensible) que pueden ser identificados por sus niveles de marcadores. Estos pacientes pueden interrumpir su terapia actual y los tratamientos alternativos prescritos.

XI. Ejemplos

Se ofrecen Los siguientes ejemplos para ilustrar, pero no limitar, la invención reivindicada.

Ejemplo 1. La leptina discrimina entre las muestras de pacientes con SII y sin SII.

Este ejemplo ilustra que la determinación de la presencia o el nivel de leptina es útil para la clasificación de una muestra de paciente como una muestra con SII, por ejemplo, confirmando el SII. La concentración de leptina se midió en muestras de suero de pacientes normales, con SII, con EII (es decir, EC, CU) y con enfermedad celíaca utilizando un inmunoensayo (es decir, ELISA). Como se muestra en la Figura 3, el análisis de cuartiles reveló que los niveles de leptina fueron elevados en las muestras del SII en relación a muestras sin SII (es decir, EC, CU, enfermedad celíaca, normales). Por lo tanto, la leptina puede discriminar de manera ventajosa entre muestras con SII y muestras sin SII.

La leptina también es útil para distinguir entre diversas formas de SII. La Figura 4A muestra los resultados de un ELISA donde se midieron los niveles de leptina en muestras de pacientes normales, con EII (es decir, EC, CU), y con enfermedad celíaca y muestras de pacientes que tienen SII-A, SII-C, o SII-D. Los niveles de leptina fueron elevados en las muestras de los pacientes SII-A y SII-D en relación con muestras de SII-C. La Figura 4B muestra las diferencias de los niveles de leptina entre las muestras de los pacientes mujeres con SII en comparación con los pacientes masculinos con SII.

Ejemplo 2. TWEAK discrimina entre muestras de pacientes con SII y sin SII.

Este ejemplo ilustra que la determinación de la presencia o nivel de TWEAK es útil para la clasificación de una muestra de paciente como una muestra con SII, por ejemplo, confirmando el SII. La concentración de TWEAK se midió en muestras de pacientes normales, control GI, con SII, y con EII (es decir, EC, CU), utilizando un inmunoensayo (es decir, ELISA). Como se muestra en la Figura 5, el análisis de cuartiles reveló que los niveles

TWEAK estaban elevados en las muestras del SII en relación a muestras sin SII (es decir, EC, CU, control GI, normales). Por lo tanto, TWEAK puede discriminar de manera ventajosa entre muestras con SII y muestras sin SII.

5 Ejemplo 3. IL-8 discrimina entre muestras de pacientes con SII y muestras normales.

Este ejemplo ilustra que la determinación de la presencia o nivel de IL-8 es útil para la clasificación de una muestra de paciente como una muestra con SII, por ejemplo, confirmando el SII. La concentración de IL-8 se midió en muestras de pacientes normales, control GI, con SII, y con EII (es decir, EC, CU), y pacientes con enfermedad celíaca utilizando un inmunoensayo (es decir, ELISA). Como se muestra en la Figura 6A, el análisis de cuartiles reveló que los niveles de IL-8 estaban elevados en las muestras del SII en relación con las muestras normales. Por lo tanto, IL-8 puede discriminar ventajosamente entre las muestras de pacientes con SII y d

pacientes normales. La figura 6b muestra un análisis de histograma con porcentaje acumulativo que demuestra que la IL-8 discrimina aproximadamente el 45% de las muestras de pacientes con SII a partir de muestras normales del paciente a un nivel de corte de 40 pg/ml. IL-8 también puede discriminar aproximadamente el 55% de las muestras de pacientes con enfermedad celíaca de muestras de pacientes normales al mismo nivel de corte. La Figura 7 muestra un análisis de histograma con porcentaje acumulativo demostrando que la IL-8 discrimina aproximadamente el 80% de las muestras de pacientes con SII de muestras de pacientes normales a un nivel de corte de 30 pg/ml. Un método ejemplar para llevar a cabo el análisis de histograma con porcentaje acumulativo se proporciona a continuación.

La Figura 8 muestra los resultados de un ELISA donde se midieron los niveles de IL-8 en las muestras de pacientes control sanos y muestras de pacientes que tienen SII-D, SII-C, o SII-A. Los niveles de IL-8 estaban elevados en las muestras de pacientes SII-D, SII-C, y SII-A en relación con las muestras control.

Ejemplo 4. EGF discrimina entre muestras de pacientes con SII y con EII.

Este ejemplo ilustra que la determinación de la presencia o nivel de EGF es útil para la clasificación de una muestra de paciente como una muestra con SII, por ejemplo, confirmando el SII o descartando la EII. La concentración de EGF se midió en muestras de pacientes normales, control de GI, con SII, con EII (es decir, EC, CU), y con enfermedad celíaca usando un inmunoensayo (es decir, ELISA). Como se muestra en la Figura 9A, el análisis de cuartiles reveló que los niveles de EGF eran más bajos en las muestras con SII en relación a las muestras con EII. Por lo tanto, el EGF puede discriminar ventajosamente entre muestras de pacientes con SII y con EII.

La Figura 9B muestra un análisis de histograma con porcentaje acumulativo que demuestra que EGF discrimina aproximadamente el 60% de las muestras de pacientes con SII de muestras de pacientes con EII en un nivel de corte de 300 pg/ml. EGF también puede discriminar alrededor del 45% de las muestras de pacientes con enfermedad celíaca de muestras normales del paciente al mismo nivel de corte. Un método ejemplar para llevar a cabo el análisis de histograma con porcentaje acumulativo se proporciona a continuación.

Ejemplo 5. NGAL discrimina entre muestras de pacientes con SII y muestras normales.

Este ejemplo ilustra que la determinación de la presencia o nivel de NGAL es útil para la clasificación de una muestra de paciente como una muestra con SII, por ejemplo, confirmando el SII. La concentración de NGAL se midió en muestras de pacientes normales, con SII, con EII, y con enfermedad celíaca utilizando un inmunoensayo (es decir, ELISA). Como se muestra en la Figura 10, el análisis de cuartiles reveló que los niveles de NGAL estaban elevados en las muestras con SII en relación con las muestras normales. Por lo tanto, NGAL puede discriminar de manera ventajosa entre las muestras con SII y las muestras normales del paciente.

Ejemplo 6. MMP-9 discrimina entre muestras de pacientes con SII y muestras de pacientes con EII.

Este ejemplo ilustra que la determinación de la presencia o nivel de MMP-9 es útil para la clasificación de una muestra de paciente como una muestra de SII, por ejemplo, confirmando el SII o descartando la EII. La concentración de MMP-9 se midió en muestras de pacientes normales, control GI, con SII y con EII utilizando un inmunoensayo (es decir, ELISA). Como se muestra en la Figura 11, el análisis de cuartiles reveló que los niveles de MMP-9 fueron menores en las muestras de SII en relación a las muestras con EII. De este modo, MMP-9 puede discriminar de manera ventajosa entre las muestras de pacientes con SII y con EII.

Ejemplo 7. El complejo NGAL/MMP-9 discrimina entre muestras de pacientes con SII y con EII.

Este ejemplo ilustra que la determinación de la presencia o nivel de un complejo de NGAL y MMP-9 (es decir, del complejo NGAL/MMP-9) es útil para la clasificación de una muestra de paciente como una muestra de SII, por ejemplo, confirmando el SII o descartando la EII. La concentración del complejo NGAL/MMP-9 se midió en

muestras de pacientes normales, con SII y con EII utilizando un inmunoensayo (es decir, ELISA). Como se muestra en la Figura 12, el análisis de cuartiles reveló que los niveles del complejo NGAL/MMP-9 fueron más bajos en las muestras de SII en relación a las muestras con EII. De este modo, el complejo NGAL/MMP-9 puede discriminar de manera ventajosa entre las muestras de pacientes con SII y con EII.

Ejemplo 8. La sustancia P discrimina entre muestras de pacientes con SII y normales.

Este ejemplo ilustra que la determinación de la presencia o el nivel de la sustancia P es útil para la clasificación de una muestra de paciente como una muestra de SII, por ejemplo, confirmando el SII. La concentración de la sustancia P se midió en muestras de pacientes normales, con SII, EII (es decir, CD, UC) y enfermedad celíaca utilizando un inmunoensayo (es decir, ELISA). Como se muestra en la Figura 13, el análisis de cuartiles reveló que los niveles de sustancia P eran elevados en las muestras con SII en relación con las muestras normales. Por lo tanto, la sustancia P puede discriminar de manera ventajosa entre muestras de pacientes con SII y normales.

Ejemplo 9. Análisis de histograma con porcentaje acumulativo.

La Figura 14 muestra un análisis de histograma con porcentaje acumulativo usando la lactoferrina como un ejemplo no limitante basado en la frecuencia de muestras en un intervalo de concentraciones de lactoferrina en el suero. Estos valores se pueden representar como un histograma gráfico de barras estándar (barras grises) que representan la frecuencia frente a la concentración. Cada frecuencia dividida por el número total de muestras proporciona la frecuencia porcentual para ese rango, normalizada para el tamaño de la población de muestreo. La frecuencia porcentual para cada rango sucesivo añadido a la suma de rangos inferiores es la frecuencia porcentual acumulativa, que se representa para generar una curva que culmina en un 100 por ciento con la máxima concentración de lactoferrina. La curva de frecuencia acumulada para cada población de pacientes se combina entonces en una sola gráfica para permitir la visualización más intuitiva de las diferencias medidas entre las diferentes poblaciones. Cuanta mayor sea la distancia de una curva particular a otra curva, mayor será la probabilidad de que los pacientes se puedan asignar con precisión a una de las dos poblaciones.

Ejemplo 10. Algoritmo estadístico combinatorial para predecir el SII.

Muestras

Se obtuvieron las muestras de suero de 2.357 pacientes de forma retrospectiva de múltiples centros (Tabla 2). El investigador principal en cada localización proporcionó los diagnósticos para todas las muestras tras biopsias y/o resultados de colonoscopia. En las localizaciones se extrajeron muestras de aproximadamente 1 ml en SST o separadores de suero. Los tubos se centrifugaron y se congelaron a -70°C hasta su envío. Las muestras se envían con conservadores de frío y tras la recepción se centrifugaron de nuevo y se congelaron a -70°C hasta que se analizaron.

Tabla 2. Centros utilizados para la obtención de muestras para el estudio de cohortes, N = 2.357

Ubicación	Nº de pacientes
CA	402 (HC + EII)
Toronto, Canadá	1287 (HC + EII)
Herestraat, Bélgica	319 (HC + EII)
Bethesda, MD	163 (SII)
Nueva York, NY	31 (SII)
Boston, MA	59 (SII)
Chicago, IL	60 (SII)
Lebanon, NH	36 (SII)
SII = síndrome del Intestino Irritable, EII = enfermedad inflamatoria intestinal, HC = controles sanos. No se utilizaron todas las muestras de EII en el desarrollo de la prueba.	

Ensayos

Los niveles séricos de ANCA, ASCA-G, anticuerpos anti-OMP-C, los anticuerpos anti-Cbirl, y la IL-8 se llevaron a cabo usando un ELISA o un ensayo de inmunofluorescencia. El rendimiento analítico de estos ensayos ha sido previamente validado. Los niveles de IL-8 se midieron con un equipo comercial de ELISA (Invitrogen).

Análisis estadístico

En este estudio, se desarrolló un nuevo enfoque que utiliza dos clasificadores estadísticos de aprendizaje diferentes (por ejemplo, bosques aleatorios (RF) y redes neuronales artificiales (ANN)) para predecir el SII en base a los niveles y/o presencia de un grupo de marcadores serológicos. Estos clasificadores estadísticos de aprendizaje utilizan métodos estadísticos multivariantes, como, por ejemplo, los perceptrones multicapa de

retropropagación con alimentación directa, que pueden adaptarse a los datos complejos y tomar decisiones basadas estrictamente en los datos presentados, sin las limitaciones de los clasificadores estadísticos habituales. En particular, un enfoque combinatorial que hace uso de múltiples funciones discriminantes mediante el análisis de los niveles de marcadores con más de un clasificador estadístico de aprendizaje se creó para mejorar aún más la sensibilidad y especificidad de la prueba de diagnóstico. Un método preferible es una combinación de RF y ANN aplicado en tándem. La exactitud global se utilizó para determinar el funcionamiento clínico de la prueba en la población de validación.

Los valores del marcador de más de 2.000 muestras de pacientes se dividieron en primer lugar entre las cohortes de entrenamiento, de prueba y de validación (Tabla 3). Diferentes muestras de pacientes se utilizaron con propósito de entrenamiento, de prueba y de validación.

Tabla 3. Conjuntos de muestras utilizados para crear algoritmos diagnósticos.

	Número de muestras	Prevalencia del SII	Normal/SII/EII
Cohorte de entrenamiento	263	30%	108/79/76
Cohorte de prueba	100	35%	36/35/29
Total: entrenamiento y prueba	363	31%	144/114/105
Cohorte de validación	200	28%	86/55/59
Los pacientes normales y con EII se utilizaron como controles sin SII. Las muestras con SII fueron una mezcla de SII-D, SII-C y SII-A.			

Bosques aleatorios

Los niveles de anticuerpos de cada uno de los 4 ensayos de ELISA (predictores) y el diagnóstico (0 = sin SII, 1 = SII, 2 = EII, variable dependiente) de una cohorte de 263 muestras de pacientes (30% de prevalencia de SII, conjunto de entrenamiento, que se ilustra en la Tabla 2) se utilizaron como entrada de datos para el módulo de programa de RF. Se crearon múltiples modelos de RF y se analizó la exactitud de la predicción de SII utilizando la cohorte de prueba. Se seleccionaron los mejores modelos de predicción de RF y se analizó la exactitud de la predicción de SII con los datos de la cohorte de validación.

Se utilizaron varios modelos de RF para hacer predicciones con SII, con EII o sin SII a partir del conjunto de entrenamiento. Los datos generados se utilizaron como datos de entrada para el entrenamiento de las redes neuronales. Las salidas del módulo de programa de RF incluyen un valor de predicción (es decir, 0 [sin SII], 1 [con SII] o 2 [con EII]) y 3 valores de probabilidad o confianza (uno para cada predicción). Se utilizaron los tres valores de probabilidad junto con los niveles de los marcadores, como valores de predicción para su posterior análisis estadístico utilizando ANN. Una representación esquemática de procesamiento de datos se ilustra en la Figura 15. La Figura 16 ilustra el conjunto de datos obtenidos utilizando el modelo de la Figura 15.

Redes neuronales artificiales

Los valores de los marcadores y las probabilidades de las predicciones sin SII, con SII y con EII obtenidas a partir del modelo de RF (Salford Systems, San Diego, CA) fueron utilizados como predictores y el diagnóstico como variable dependiente para crear múltiples ANN con el uso del programa de redes neuronales. El módulo Intelligent Problem Solver del paquete de programas de redes neuronales (Statistica; Statsoft, Inc.; Tulsa, OK) se utilizó para crear modelos de ANN en una retropropagación de alimentación directa, y modo de clasificación con la cohorte de entrenamiento. Se crearon más de 1000 ANN usando los datos de entrada de varios modelos de RF. Se seleccionaron los mejores modelos en base al menor error en la predicción de SII en el conjunto de datos de prueba.

En la Figura 17 se muestra un diagrama de un ANN. Este modelo se compone de un perceptron multinivel que contiene 1 capa oculta con 10 neuronas. La activación relativa de la neurona se identifica por su color.

Algoritmo de validación y exactitud de la predicción

El algoritmo seleccionado se validó luego con una cohorte de muestras que no se habían utilizado en los conjuntos de entrenamiento y de prueba (es decir, el conjunto de validación). Los datos obtenidos de este ensayo se utilizaron para calcular todos los parámetros de exactitud del algoritmo.

Además, se llevó a cabo la validación final y el cálculo de exactitud en los datos de una cohorte de muestras no solapante con los conjuntos de entrenamiento y de prueba. La matriz de confusión de 2x2 (Tabla 4) muestra los resultados del algoritmo de predicción en la cohorte de validación.

Tabla 4. Matriz de confusión de 2x2.

Matriz 2x2 de la predicción del algoritmo sobre la cohorte de validación		
	sin SII	con SII
sin SII	91	8
con SII	7	125

La exactitud de la predicción del algoritmo para el SII se muestra en la Tabla 5.

5

Tabla 5. Rendimiento clínico del algoritmo en la predicción de SII.

Exactitud de la predicción de SII del modelo híbrido probado en la cohorte de validación			
TP	187	Sensibilidad de SII	91,2%
FN	18	Especificidad de SII	86,8%
FP	19	VPP de SII	90,8%
TN	125	VPN de SII	87,4%
TP = positivos verdaderos, FN = falsos negativos, PF = falsos positivos, TN = negativos verdaderos, VPP = valor predictivo positivo, VPN = valor predictivo negativo.			
La exactitud de la predicción se calculó utilizando el algoritmo en el conjunto de validación			

La sensibilidad y especificidad de la predicción del SII fueron de aproximadamente un 91% y aproximadamente un 87%, respectivamente. El VPP y VPN del SII fueron aproximadamente 91% y aproximadamente el 87%, respectivamente. La identificación exacta del SII la ponen de manifiesto las sensibilidades y especificidades cercanas o superiores al 90%. Se calculó la exactitud global de la predicción, como se muestra en la Tabla 6. El modelo híbrido de RF /ANN predijo el SII con un alto nivel de exactitud.

10

Tabla 6. Exactitud global de predicción

Modelo híbrido	predijo correctamente/Número total diagnosticado	% Predicción correcta
Exactitud general del ensayo	159/200	80%
Porcentaje de predicción correcta calculado de la siguiente manera: Exactitud = TP de SII + TP de EII + TN / Número total de muestras analizadas.		

15 Ejemplo 11. Algoritmo estadístico de bosque aleatorio para la predicción de SII.

Conjunto de datos

20 Un total de 939 muestras de pacientes se analizaron mediante un algoritmo estadístico de bosque aleatorio (RF). Las muestras se dividieron en cohortes de entrenamiento, de prueba y de validación de la siguiente manera: (1) 739 muestras de entrenamiento y de prueba (Tabla 7); y (2) 200 muestras de validación. Se utilizaron diferentes muestras de pacientes con propósito de entrenamiento, prueba y para la validación.

Tabla 7. Composición de la cohorte de entrenamiento y prueba.

Composición de la cohorte de entrenamiento/ prueba		
normal	257	35%
SII	152	21%
celíaca	34	5%
CD	154	21%
UC	142	19%
Total	739	

25

Ensayos

Los niveles séricos de IL-8, lactoferrina, ANCA, ASCA-G, y anticuerpos anti-OMP-C se llevaron a cabo usando un ELISA como se ha descrito anteriormente.

30

Enfoque del estudio

En este estudio, se desarrolló un nuevo enfoque que utiliza un solo clasificador estadístico de aprendizaje (es decir, bosques aleatorios) para predecir el SII en base a los niveles y/o presencia de un panel de marcadores serológicos. Los niveles de anticuerpos de cada uno de los ensayos de ELISA (predictores, Tabla 8) y el diagnóstico de la cohorte de muestras de pacientes de entrenamiento/ prueba se utilizaron como datos de entrada para el módulo de programa de RF (Salford Systems, San Diego, CA). Se crearon modelos de múltiples RF y se analizó la exactitud de la predicción de SII utilizando la cohorte de entrenamiento/ prueba. Se

35

seleccionaron los mejores modelos de predicción de RF y se evaluó la exactitud de la predicción de SII con datos de la cohorte de validación.

Tabla 8. Importancia predictiva de cada uno de los marcadores diagnósticos analizados.

Marcador	Puntuación
IL-8	100,0
lactoferrina	34.14
ANCA	19.15
Anticuerpos Anti-Omp-C	7,18
ASCA-G	6.14
Los valores se han normalizado frente a IL-8.	

Validación del algoritmo y exactitud de la predicción

El algoritmo de RF seleccionado se validó entonces con una cohorte de muestras que no se habían utilizado en los conjuntos de entrenamiento y de pruebas (es decir, el conjunto de validación). Los datos obtenidos de este ensayo se utilizaron para calcular todos los parámetros de exactitud del algoritmo.

La exactitud de la predicción del algoritmo de RF del SII se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Funcionamiento clínico del algoritmo de RF en la predicción de SII.

Casos	Total de casos	Porcentaje correcto	sin SII (N = 135)	con SII (N = 65)
sin SII	151	84,7 (especificidad)	128	23
con SII	49	85,7 (sensibilidad)	7	42

La sensibilidad y especificidad de predicción de SII fueron del 85,7% y 84,7%, respectivamente. La identificación exacta del SII la puso de manifiesto una sensibilidad y especificidad cercanas o superiores al 85%. El modelo de RF predijo el SII con un alto nivel de exactitud.

La Figura 18 ilustra la distribución de las muestras con SII y sin SII, antes y después de utilizar el modelo con el algoritmo de RF utilizando los niveles séricos de IL-8, EGF, ANCA y ASCA-G.

Ejemplo 12. Algoritmo estadístico de árbol de clasificación para la predicción de SII.

Conjunto de datos

Aproximadamente 430 casos se analizaron mediante un algoritmo estadístico de árbol de clasificación. Estos casos podían tener información de marcadores serológicos para la IL-8, ANCA ELISA, anticuerpos anti-OMP-C, ASCA-A, ASCA-G, anticuerpos anti-Cbir1, pANCA, y/o lactoferrina.

Enfoque de estudio

En este estudio, se desarrolló un enfoque novedoso que utiliza un solo clasificador estadístico de aprendizaje (es decir, los árboles de clasificación) para predecir el SII en base a los niveles y/o presencia de un panel de marcadores serológicos. Con el fin de generar estimaciones robustas de la eficacia de cada método de clasificación, se realizó una simulación con 500 iteraciones. Para cada iteración, los datos se dividieron en un conjunto de entrenamiento y un conjunto de validación. Cada vez, el 80% de las observaciones se asignaron al azar al grupo de aprendizaje y el 20% de las observaciones se asignaron al azar al conjunto de validación. Utilizando el conjunto de entrenamiento, se construyeron modelos de clasificación utilizando árboles de clasificación.

Árboles de clasificación

Los árboles de clasificación se construyen mediante repetidas divisiones binarias de subconjuntos de datos, comenzando en el conjunto completo de datos. Cada vez que se realiza una división binaria, hay un intento de crear subconjuntos descendientes que son "más puros" o más homogéneos que el subconjunto parental. Esto se hace computacionalmente encontrando una división que logre la mayor disminución en el promedio de impurezas de los subconjuntos descendientes. La impureza se suele definir en términos operativos por uno de estos tres indicadores:

- 1) tasa de clasificación errónea;
- 2) índice de Gini; o
- 3) entropía (desviación).

Aunque minimizar la tasa del error de clasificación es el objetivo general, se considera un criterio pobre para la búsqueda de divisiones, ya que produce sólo una optimización en un solo paso. El índice de Gini y el criterio de entropía producen resultados similares para los problemas de dos clases (Hastie et al., *The elements of Statistical Learning*, Nueva York; Springer (2001)). Los nodos creados por cada división binaria se dividen de forma recursiva hasta que una de las tres condiciones siguientes es verdadera:

- 1) Todos los casos del nodo son de la misma clase observada (es decir, la impureza es igual a cero);
- 2) El nodo sólo contiene observaciones que tienen mediciones idénticas (es decir, no hay manera de dividir las observaciones restantes); o,
- 3) El nodo es pequeño, normalmente de 1 a 5 observaciones.

Una vez que se ha llegado a un punto terminal para cada nodo, el árbol se poda hacia arriba. Este procedimiento crea una secuencia de árboles más y más pequeños. La impureza total de cada uno de estos árboles se puede medir y el que tiene la menor impureza total se selecciona. Este puede ser considerado el "mejor" árbol de clasificación (Breiman et al., *Classification and Regression Trees*, Wadsworth, Belmont, CA (1984)).

Una vez que se selecciona el "mejor" árbol, la clase predicha para cada uno de los nodos terminales se determina mediante "voto" de mayoría simple de cada observación en el nodo. Para la clasificación de un nuevo caso, la nueva observación simplemente se envía a lo largo del árbol. La clase predicha de la nueva observación es la clase predicha para el nodo terminal en el que se coloca. Discusión y ejemplos adicionales se pueden encontrar, por ejemplo, en Hastie et al., *supra*; y Venables et al., *Modern Applied Statistics with S-Plus*, 4ª edición; Nueva York; Springer (2002).

La Figura 19 muestra un árbol de clasificación de tres nodos para clasificar una muestra como una muestra con SII o muestra sin SII en base a los niveles en los ELISA de IL-8, lactoferrina y ANCA. Este árbol de clasificación proporciona una tasa de clasificación correcta global aproximada del 87,6%.

Ejemplo 13. Cuestionario para identificar la presencia o severidad de los síntomas asociados con el SII.

Este ejemplo ilustra un cuestionario que es útil para identificar la presencia o la gravedad de uno o más síntomas relacionados con el SII en un individuo. El cuestionario puede ser completado por el individuo en la clínica o consultorio médico, o puede llevarse a casa y presentarse cuando el individuo vuelva a la clínica o consultorio médico, por ejemplo, para que se le extraiga sangre.

El cuestionario puede comprender una primera sección que contenga un conjunto de preguntas que requieren que la persona de respuestas en cuanto a la presencia o severidad de uno o más síntomas asociados con el SII. El cuestionario incluye generalmente preguntas dirigidas a la identificación de la presencia, la gravedad, la frecuencia y/o duración de los síntomas relacionados con el SII, como dolor de pecho, malestar en el pecho, ardor de estómago, sensación incómoda de saciedad después de tomar una comida de tamaño normal, incapacidad de terminar una comida de tamaño normal, dolor abdominal, malestar abdominal, estreñimiento, diarrea, hinchazón y/o distensión abdominal.

En ciertos casos, la primera sección del cuestionario incluye la totalidad o una parte de las preguntas de un cuestionario elaborado por el Rome Foundation Board basado en los criterios Rome III, disponible en la página <http://www.romecriteria.org/cuestionarios/>. Por ejemplo, el cuestionario puede incluir la totalidad o una parte de las 93 preguntas que figuran en las páginas de 920 a 936 del cuestionario de diagnóstico Rome III para los trastornos gastrointestinales funcionales en el adulto (Apéndice C), disponible en <http://www.romecriteria.org/pdfs/AdultFunctGIQ.pdf>. Preferiblemente, la primera sección del cuestionario contiene 16 de las 93 preguntas que figuran en el cuestionario de diagnóstico Rome III (véase la Tabla 10). Alternativamente, la primera sección del cuestionario puede contener un subconjunto (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15) de las 16 preguntas que se muestran en la Tabla 10. Como ejemplo no limitante, las siguientes 10 preguntas que figuran en la Tabla 10 se pueden incluir en el cuestionario: las preguntas nº 2, 3, 5, 6, 9, 10, 11, 13, 15 y 16. Un experto en la técnica apreciará que la primera sección del cuestionario puede comprender preguntas similares a las preguntas que se muestran en la Tabla 10 con respecto al dolor, incomodidad y/o cambios en la consistencia de las heces.

Tabla 10. Ejemplo de la primera sección de un cuestionario para identificar la presencia o gravedad de los síntomas relacionados con el SII.

1 .	En los últimos 3 meses, ¿con qué frecuencia se presentó dolor o malestar en el centro de su pecho (no relacionado con problemas del corazón)?	0 1 2 3 4 5 6	Nunca Menos de un día al mes Un día al mes De dos a tres días al mes Un día a la semana Más de un día a la semana Cada día
2 .	En los 3 últimos meses, con qué frecuencia tuvo acidez estomacal (un malestar por ardor o dolor por quemazón en el pecho)?	0 1 2 3 4 5 6	Nunca Menos de un día al mes Un día al mes De dos a tres días al mes Un día a la semana Más de un día a la semana Cada día
3 .	En los últimos 3 meses, ¿con qué frecuencia te sientes incómodamente lleno después de una comida de tamaño normal?	0 1 2 3 4 5 6	Nunca Menos de un día al mes Un día al mes De dos a tres días al mes Un día a la semana Más de un día a la semana Cada día
4 .	En los últimos 3 meses, ¿con qué frecuencia usted no pudo terminar una comida de tamaño normal?	0 1 2 3 4 5 6	Nunca Menos de un día al mes Un día al mes De dos a tres días al mes Un día a la semana Más de un día a la semana Cada día
5 .	En los últimos 3 meses, ¿con qué frecuencia se presenta dolor o ardor en medio de su abdomen, por encima de su ombligo, pero no en el pecho?	0 1 2 3 4 5 6	Nunca Menos de un día al mes Un día al mes De dos a tres días al mes Un día a la semana Más de un día a la semana Cada día
6 .	En los últimos 3 meses, ¿con qué frecuencia ha tenido molestias o dolor en cualquier parte de su abdomen?	0 1 2 3 4 5 6	Nunca Menos de un día al mes Un día al mes De dos a tres días al mes Un día a la semana Más de un día a la semana Cada día
7 .	En los últimos 3 meses, ¿con qué frecuencia tiene menos de tres evacuaciones intestinales (0-2) a la semana?	0 1 2 3 4	Nunca o raramente A veces A menudo La mayoría de las veces Siempre
8 .	En los últimos 3 meses, ¿con qué frecuencia usted tiene heces duras o grumosas?	0 1 2 3 4	Nunca o raramente A veces (25% de las veces) A menudo (50% de las veces) La mayoría de las veces (75% de las veces) Siempre
9.	En los últimos 3 meses, ¿con qué frecuencia usted se ha esforzado durante las evacuaciones intestinales?	0 1 2 3 4	Nunca o raramente A veces A menudo La mayoría de las veces Siempre
10.	En los últimos 3 meses, ¿con qué frecuencia usted ha tenido sensación de vaciado incompleto después de evacuar?	0 1 2 3 4	Nunca o raramente A veces A menudo La mayoría de las veces Siempre

11.	En los últimos 3 meses, ¿con qué frecuencia usted tiene una sensación de que las heces no podían pasar, (es decir, estaban bloqueadas), cuando tenían que defecar?	0 1 2 3 4	Nunca o raramente A veces A menudo La mayoría de las veces Siempre
12.	En los últimos 3 meses, ¿con qué frecuencia se presionó sobre o alrededor de su ano para retirar las heces con el fin de completar una evacuación intestinal?	0 1 2 3 4	Nunca o raramente A veces A menudo La mayoría de las veces Siempre
13.	¿Alguno de los síntomas del estreñimiento que figuran en las preguntas anteriores de 27-32 comenzaron hace más de 6 meses?	0 1	No Si
14.	En los 3 últimos meses, ¿con qué frecuencia ha tenido usted heces blandas, muy blandas o acuosas?	0 1 2 3 4	Nunca o raramente A veces (25% de las veces) A menudo (50% de las veces) La mayoría de las veces (75% de las veces) Siempre
15.	En los últimos 3 meses, ¿con qué frecuencia usted tiene hinchazón o distensión?	0 1 2 3 4 5 6	Nunca Menos de un día al mes Un día al mes De dos a tres días al mes Un día a la semana Más de un día a la semana Cada día
16.	¿Los síntomas de hinchazón o distensión comenzaron hace más de 6 meses?	0 1	No Si

El cuestionario también puede comprender una segunda sección que contiene un conjunto de preguntas que piden a la persona a dar respuestas sobre la presencia o la gravedad de los pensamientos negativos o sentimientos asociados a tener dolor o las molestias relacionadas con el SII. Por ejemplo, el cuestionario puede incluir preguntas dirigidas a la identificación de la presencia, gravedad, frecuencia y/o duración de la ansiedad, miedo, nerviosismo, preocupación, temor, preocupación, estrés, depresión, desesperanza, desesperación, pesimismo, duda y/o negatividad cuando el individuo está experimentando dolor o malestar asociado con uno o más síntomas del SII.

En ciertos casos, la segunda sección del cuestionario incluye la totalidad o una parte de las preguntas de un cuestionario descrito por Sullivan et al., The Pain Catastrophizing Scale: Development and Validation, Psychol. Evaluar., 7: 524-532 (1995). Por ejemplo, el cuestionario puede incluir una serie de preguntas para que las responda un individuo de acuerdo con una escala de catastrofismo del dolor (PCS), que indica el grado en el que un individuo tiene ciertos pensamientos y sentimientos negativos cuando experimentan dolor: 0 = nada; 1 = en un ligero grado; 2 = en un grado moderado; 3 = en un alto grado; 4 = todo el tiempo. La segunda sección del cuestionario puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más preguntas o sentencias relacionadas con la identificación de la presencia o la gravedad de los pensamientos o sentimientos negativos asociados a tener dolor o malestar relacionado con el SII. Como ejemplo no limitante, a un individuo se le puede pedir que evalúe el grado en que él o ella tiene uno o más de los siguientes pensamientos y sentimientos cuando experimenta dolor: "Me preocupa todo el tiempo acerca de si el dolor va a terminar"; "Siento que no puedo soportarlo más"; "Me asusta que el dolor vaya a empeorar"; "Quiero ansiosamente que el dolor desaparezca"; y "Sigo pensando en lo mucho que duele." Un experto en la técnica entenderá que el cuestionario puede incluir cuestiones similares con respecto a los pensamientos o sentimientos negativos asociados a tener dolor o molestias relacionadas con el SII.

El cuestionario puede incluir sólo las preguntas de la primera sección del cuestionario o un subconjunto de las mismas (véase, por ejemplo, la Tabla 10). El cuestionario también puede incluir sólo las preguntas de la segunda sección del cuestionario o un subconjunto de las mismas.

Al finalizar el individuo el cuestionario, los números correspondientes a las respuestas a cada pregunta pueden sumarse y el valor resultante se puede combinar con el análisis de uno o más marcadores de diagnóstico en una muestra del individuo y procesarse usando los algoritmos estadísticos descritos en este documento para aumentar la exactitud de la predicción de SII.

Como alternativa, una respuesta de "Sí" o "No" del individuo a la siguiente pregunta: "¿Está usted actualmente experimentando algún síntoma?" puede combinarse con el análisis de uno o más de los biomarcadores

descritos en el presente documento y procesarse usando un único algoritmo estadístico o una combinación de algoritmos estadísticos para aumentar la exactitud de la predicción de SII.

Ejemplo 14. Selección de marcadores diagnóstico y síntomas para predecir el SII.

Este ejemplo ilustra técnicas para la selección de características que pueden incluirse en los perfiles de marcadores diagnósticos y síntomas para la predicción de SII.

1. Introducción

El objetivo de la clasificación es tomar un vector de entrada X y asignarlo a uno o más de K clases distintas C_j , donde j es el rango (1..K). (Bishop, Pattern Recognition and Machine Learning, Springer, pág. 179 (2006)). En el contexto de un algoritmo diagnóstico de prueba, el vector de entrada puede consistir en una combinación de mediciones cuantitativas (por ejemplo, biomarcadores), variables nominales (por ejemplo, género) y variables ordinales (por ejemplo, presencia de síntomas o su gravedad a partir de las respuestas de la encuesta). Estos componentes del vector de entrada pueden llamarse en conjunto las características. El vector de entrada describe un paciente para quien se desea un diagnóstico. La salida del modelo es el diagnóstico, una variable categórica (por ejemplo, una variable binaria, donde 0 = sano y 1 = enfermo).

Una prueba de diagnóstico implica especificar las características del vector de entrada, y el algoritmo utilizado para predecir las clasificaciones. Si bien es posible utilizar un modelo de máximo, en el cual se incluyen todas las características de entrada y sus interacciones, esto no es lo preferible, por razones de economía y ahorro de recursos (Crawley, Statistical Computing: An introduction to Data Analysis using S-Plus, Wiley, pág. 211 (2002)). La economía sugiere que, dado que la recolección de datos de entrada implica un coste, debe sopesarse el coste de obtener una entrada frente a su beneficio. El ahorro de recursos sugiere que los modelos más simples son los preferibles, y que los datos de entrada y/o términos que no son significativos no deben incluirse, a fin de optimizar la claridad y fiabilidad de la prueba.

Pueden utilizarse una serie de técnicas para seleccionar las características del vector de entrada que se utilizará en una prueba de diagnóstico. Estas técnicas se discuten en los siguientes párrafos. Algunas de las técnicas de selección de entrada son independientes del algoritmo, y se pueden usar con cualquier algoritmo de clasificación. Otras son específicas de algoritmo. Se proporcionan ejemplos de varias técnicas independientes de algoritmo, seguidas de técnicas que son aplicables específicamente a los bosques aleatorios, la regresión logística o algoritmos de análisis discriminante.

2. Técnicas independientes de algoritmo

Al considerar las técnicas de aplicación general, están disponibles dos familias de métodos: estadísticos y exploratorios por etapas. Si los datos de entrada se ajustan a ciertas suposiciones (con respecto a la normalidad y la igualdad de la varianza), se pueden usar técnicas estadísticas, como se describe a continuación. Los métodos por etapas se pueden usar tanto si los datos cumplen los supuestos o si no.

2.1 Técnicas estadísticas

Se pueden utilizar una serie de pruebas estándar clásicas con las características, tanto de forma individual (pruebas univariantes) como en grupos (pruebas multivariantes). Por ejemplo, para los biomarcadores cuantitativos, las clasificaciones diagnósticas en los datos de entrada dan lugar a medias de grupo que se pueden comparar mediante pruebas t . Esto requiere que los dos supuestos sean válidos: la variable se debe distribuir normalmente en cada grupo y la varianza de los dos grupos debe ser la misma (Petrie y Sabin, Medical Statistics at a Glance, 2ª Ed., Blackwell Publishing, pág. 52 (2005)). Esta prueba tiene un análogo multivariante: en una comparación multivariante puede utilizarse la prueba T^2 de Hotelling (Flury, a First Course in Multivariate Statistics, Springer-Verlag, pág. 402 (1997)).

Si no se cumplen los supuestos requeridos, están disponibles una serie de pruebas no paramétricas, tales como la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney, la prueba de suma de rangos de Wilcoxon, y el estadístico de Kruskal-Wallis para tres o más grupos (Glantz, Primer of Biostatistics, 4ª Ed., McGraw-Hill, Capítulo 10 (1997)).

Tanto para las pruebas paramétricas como no paramétricas, los resultados pueden utilizarse para sugerir cuales de los biomarcadores (o grupos de características) poseen o no puntuaciones promedio significativamente diferentes en los grupos diagnósticos.

2.2 Métodos por pasos

Los siguientes métodos por pasos asumen que se ha elegido un algoritmo (por ejemplo, bosque aleatorio, regresión logística), pero estos métodos se pueden usar con cualquier algoritmo, y en ese sentido son independientes de algoritmo. En el contexto del algoritmo seleccionado, es deseable elegir un conjunto de

características de entre las disponibles en el vector de entrada. Para utilizar una técnica exploratoria, debe definirse una métrica de puntuación y un método de búsqueda.

2.2.1 Métrica de puntuación

El primer paso es elegir una métrica con la que se puedan puntuar los conjuntos de características que compiten. Una posible métrica es la exactitud, el porcentaje de predicciones correctas hecha por el clasificador (tanto verdaderos negativos como verdaderos positivos). Alternativamente, la métrica de puntuación se puede definir en términos de sensibilidad (el porcentaje de individuos con la enfermedad que se clasifican como afectados por la enfermedad) y/o especificidad (el porcentaje de personas sin la enfermedad que se clasifican como no afectados por la enfermedad) (Fisher & Belle, *Biostatistics: A Methodology for the Health Sciences*, Wiley-Interscience, pág. 206 (1993)). Con menor frecuencia, la métrica puede implicar también el valor predictivo positivo (VPP, el porcentaje de individuos con un test positivo que tienen la enfermedad) y el valor predictivo negativo (VPN, el porcentaje de individuos con una prueba negativa que no tienen la enfermedad).

La siguiente es una lista de métricas disponibles: exactitud, sensibilidad (sólo), especificidad (sólo), la media aritmética de sensibilidad y especificidad; la media geométrica de sensibilidad y especificidad, el mínimo de sensibilidad y especificidad y el máximo de sensibilidad y especificidad. Un conjunto similar de indicadores se puede utilizar con VPP y VPN: VPP/VPN sólo, media aritmética, media geométrica, máximo y mínimo. También es posible definir métricas que combinen sensibilidad, especificidad, VPP y VPN (por ejemplo, la media aritmética de esos cuatro valores). También es posible definir sanciones específicas para los falsos positivos y falsos negativos, en cuyo caso el resultado es que se minimice en lugar de maximizar.

2.2.2 Método de búsqueda

Para cualquiera de las métricas de puntuación definidas anteriormente, es posible evaluar cualquier algoritmo (incluyendo bosque aleatorio, regresión logística, análisis discriminante y otros) enumerando de forma exhaustiva cada posible subconjunto de características en el vector de entrada. En los casos en los que esto sea intensivo computacionalmente hasta un punto inaceptable, es posible llevar a cabo una búsqueda por etapas en el que características individuales se añaden (búsqueda hacia adelante) o se eliminan (búsqueda hacia atrás) una por una, en una serie de rondas (Petrie y Sabin, *Medical Statistics at a Glance*, 2ª Ed., Blackwell Publishing, pág. 89 (2005)).

En una búsqueda hacia adelante, se añaden características (por ejemplo, los biomarcadores, síntomas, etc.) una por una, en rondas. En la primera ronda, un vector de entrada que consta de una característica se evalúa con los datos de entrenamiento, y la mejor característica (definida por la métrica descrita anteriormente) se identifica. En la segunda ronda, se construye y evalúa un nuevo conjunto de características de entrada. Cada juego tiene dos características, una de ellas es la "mejor" característica de la primera ronda de evaluación. Se elige el mejor par de características de la segunda ronda, y se convierte en la base para la tercera ronda, en la que todos los vectores de entrada tienen tres características, dos de las cuales son las identificadas en la segunda ronda, y así sucesivamente. Este procedimiento se lleva a cabo de forma iterativa, con el número de rondas igual al número de posibles características en el vector de entrada. Al final, se selecciona el mejor vector de entrada (es decir, un conjunto de características), como se ha definido mediante la métrica.

Una búsqueda hacia atrás es similar, pero sigue un proceso de simplificación del modelo en lugar de expansión de modelo (Crawley, *Statistics: An introduction Using R*, Wiley, pág. 105 (2005)). El punto de partida es el vector de entrada con el conjunto completo de características. En cada ronda, se elige un parámetro para su eliminación, según la evaluación de la métrica descrita anteriormente.

Además de búsquedas exhaustivas hacia adelante y hacia atrás, es posible buscar estocásticamente. Un método consiste en generar de forma aleatoria un conjunto de características, que se utilizan como semillas. Cada semilla puede entonces ser evaluada tanto hacia delante como hacia atrás, y el mejor conjunto de resultados de entrada puede utilizarse. Un método alternativo es llevar a cabo múltiples búsquedas hacia adelante y/o hacia atrás, pero en cada ronda, en lugar de elegir la mejor de adición o supresión de una característica de manera determinista, se elige de forma probabilística la característica a incluir o suprimir mediante una fórmula que disminuye/aumenta monótonamente la probabilidad de adición/eliminación en base a la clasificación en la última ronda.

3. Técnicas específicas de algoritmo

Habiendo discutido los métodos para la selección de características que son aplicables a cualquier algoritmo, esta sección describe los métodos que son específicos de algoritmos particulares. Se discuten tres algoritmos representativos: bosques aleatorios, regresión logística y análisis discriminante.

3.1 Bosques aleatorios

Para los bosques aleatorios, hay disponibles dos métricas para describir la importancia de las características: importancia de permutación (Strobl et al., BMC Bioinformatics, 08:25 (2007)) y la importancia de Gini (Breiman et al., Classification and Regression Trees, Chapman & Hall/CRC, pág. 146 (1984)).

Para la importancia de permutación, la idea es comparar la puntuación de un bosque lleno con la puntuación producida por un bosque en el que se han mezclado los valores de entrada para una característica. Intuitivamente, cuanto más importante sea la función, más se reducirá la puntuación si los valores de esa característica se han permutado al azar. La disminución de la puntuación es la importancia de la permutación, y mediante la evaluación de todas las características de esta manera, su importancia puede ser clasificada.

Para la importancia de Gini, la idea es tomar una media ponderada de la mejora de los árboles individuales con el criterio de reparto "ganancia gini" producido por cada característica. Cada vez que se realiza la división de un nodo en una determinada característica, el criterio de impureza de Gini para los dos nodos descendientes es menor que el nodo padre. Sumando las disminuciones de Gini de cada característica individual de todos los árboles en el bosque da una medida de la importancia de la característica.

3.2 Regresión logística

La regresión logística se utiliza en los casos en los que la variable dependiente (por ejemplo, el diagnóstico) es categórica/nominal (Agresti, An Introduction to Categorical Data Analysis, 2ª Ed., Wiley-Interscience, Capítulo 4 (2007)). Una extensa literatura describe las técnicas para la selección de características/modelo en la regresión múltiple (Maindonald y Braun, Data Analysis and Graphics using R, 2ª Ed., Cambridge University Press, capítulo 6 (2003)).

En la regresión logística y otros tipos de regresión, la importancia de las características individuales puede evaluarse probando la hipótesis de que el coeficiente de regresión correspondiente es cero (Kachigan, Multivariate Statistical Analysis, a Conceptual Introduction, 2ª Ed., Radius Press, pág. 178 (1991)). También es posible evaluar un grupo de características sobre la base de una prueba de supresión, por ejemplo, usando una prueba F para evaluar la significación del aumento en la desviación que se produce cuando se retira un término dado a partir de un modelo de regresión (Crawley, Statistics: An Introduction using R, Wiley, pág. 103 (2005), Devore, Probability and Statistics for Engineering and the Sciences, 4ª Ed, Brooks/Cole, pág. 560 (1995)).

3.3 Análisis discriminante

El análisis discriminante describe un conjunto de técnicas en las que se supone la forma paramétrica de una función discriminante, y se ajustan los parámetros de la función discriminante. Esto contrasta con las técnicas en las que se asume y se ajusta la forma paramétrica de las densidades de probabilidad subyacente, en lugar de la función discriminante. El ejemplo clásico en esta familia de técnicas es el análisis discriminante lineal de Fisher (LDA), las técnicas y extensiones relacionadas, que incluyen el análisis discriminante cuadrático (QDA), el análisis discriminante regularizado, mezclas de análisis discriminantes, y otros (Venables y Ripley, Modern Applied Statistics with S, 4ª Ed., Springer, Capítulo 12 (2002)). La selección de características para el LDA se discute más adelante; la discusión es aplicable también a las técnicas relacionadas en esta familia.

En el LDA, los coeficientes del discriminante lineal se eligen para maximizar la separación de clases, según lo medido por la proporción entre la varianza entre clases y la varianza dentro de la clase (Everitt y Dunn, Applied Multivariate Data Analysis, 2ª Ed., Oxford University Press, pág. 253 (2001)). En este contexto, la redundancia de funciones puede inferirse formalmente (Flury, A first Course in Multivariate Statistics, Springer-Verlag, Secciones 5.6 y 6.5 (1997)). Esto se consigue probando la hipótesis de que los coeficientes de la función discriminante relevante son cero. Por inferencia sobre los coeficientes de la función discriminante, es posible construir pruebas de suficiencia/redundancia para los posibles grupos de características.

3.4 Otros algoritmos

Un gran número de otros algoritmos están disponibles para la clasificación diagnóstica, incluidas las redes neuronales, máquinas de vectores de soporte, CART (árboles de clasificación y regresión), agrupación sin supervisión (medias k, mezclas de gaussianas), vecinos más cercanos k, y muchos otros. Para muchos de estos algoritmos, están disponibles técnicas específicas del algoritmo para la evaluación y selección de características. Además, algunas técnicas se centran en la extracción de características (la elección de un menor número de características que pueden ser combinaciones lineales o no lineales de las características disponibles). Estas técnicas incluyen el análisis de componentes principales, el análisis de componentes independientes, el análisis factorial y otras variaciones (Duda et al., Pattern Classification, 2ª Ed., Wiley-Interscience, pág. 568 (2001)).

Ejemplo 15. Perfil de síntomas para la predicción del SII.

Este ejemplo ilustra las técnicas para el uso de un cuestionario para mejorar la exactitud de un algoritmo de predicción diagnóstica del SII.

En ciertos casos, la identificación de pacientes con SII se predice con mayor precisión con el uso de una o más preguntas como predictores para crear un algoritmo alternativo o datos de entrada adicionales para proporcionar sensibilidad y especificidad añadidas.

En ciertos casos, las preguntas generadas eran de tipo "¿Está experimentando algún síntoma ahora?," mientras que otras se extrajeron de cuestionarios conocidos como el Roma II, Roma III, la escala de catastrofismo del dolor (Sullivan et al., The Pain Catastrophizing Scale: Development and Validation, Psychol Assess., 7: 524-532 (1995)), y similares. Algunas de las preguntas tenían respuestas nominales (miden el grado de algún acontecimiento), mientras que otras eran categóricas (binarias). En las preguntas del Roma III, se añadió el valor nominal de todas las respuestas de un paciente para crear una única puntuación que se consideraba una puntuación simplificada de "gravedad de la enfermedad". La inclusión de esta puntuación junto con los niveles de los biomarcadores puede mejorar tanto la sensibilidad como la especificidad de un algoritmo.

La puntuación de cada pregunta (por ejemplo, 0-4) se puede utilizar como dato de entrada (predictor), junto con todos los biomarcadores. Los modelos fueron creados luego usando bosques aleatorios y redes neuronales. Tanto los bosques aleatorios como las redes neuronales tienen la capacidad de determinar las preguntas más significativas que mejoran la exactitud del algoritmo de predicción. Después de seleccionar las mejores preguntas, se utilizó una puntuación para predecir la "gravedad de la enfermedad", o nivel de catastrofismo, sumando los valores de cada pregunta para un paciente en particular. Los datos que incluían las puntuaciones del cuestionario se utilizaron para entrenar los algoritmos que utilizan los bosques aleatorios, redes neuronales y otros clasificadores estadísticos. Las preguntas del Roma II, Roma III y la escala de catastrofismo del dolor mejoraron la exactitud de la predicción cuando se utilizaron en combinación con múltiples biomarcadores para identificar a los pacientes con SII. Además, una sola pregunta: "¿Está experimentando algún síntoma actualmente?" (sí o no), fue en algunos casos tan importante como la suma puntuación de las respuestas a las preguntas del cuestionario.

La Tabla 11 muestra que un perfil de síntomas puede mejorar la exactitud de la predicción del SII. Con la inclusión de diversos datos de cuestionarios como predictores de entrada, pueden mejorarse la especificidad y la sensibilidad.

Tabla 11. Mejora de la exactitud de la predicción del SII mediante la inclusión de diversos cuestionarios como predictores de entrada.

ESCALA DE SEVERIDAD		X			X
ESCALA DE CATASTROFISMO			X		X
SÍNTOMAS ACTUALES				X	X
CBIR1	X	X	X	X	X
ANCA ELISA	X	X	X	X	X
EGF	X	X	X	X	X
ASCA IgG	X	X	X	X	X
ASCA-IgA	X	X	X	X	X
AGE	X	X	X	X	X
ANTI-OMPC	X	X	X	X	X
IL-8	X	X	X	X	X
LACTOFERRINA	X	X	X	X	X
ANTI-TRANSGLUTAMINASA	X	X	X	X	X
SENSIBILIDAD	69%	76%	70%	73%	69%
ESPECIFICIDAD	44%	89%	87%	63%	94%

Como muestran los datos en la Tabla 11, la especificidad se incrementa con el uso de los datos del cuestionario y, de promedio, también aumenta la sensibilidad. La sensibilidad es la probabilidad de una prueba positiva entre los pacientes con SII, mientras que la especificidad es la probabilidad de una prueba negativa entre los pacientes sin SII.

Aunque la anterior invención se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con el propósito de clarificar su comprensión, un experto en la técnica apreciará que se pueden practicar ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones anexadas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para clasificar si una muestra de un individuo se asocia con el síndrome del intestino irritable (SII), y dicho método comprende:

(a) determinar un perfil de marcadores diagnósticos mediante la detección de la presencia o el nivel del marcador diagnóstico débil inductor de la apoptosis relacionado con TNF (TWEAK) en dicha muestra, y
(b) clasificar dicha muestra como una muestra con SII o muestra sin SII utilizando un algoritmo basado en dicho perfil de marcadores diagnósticos, en el que dicho algoritmo es un sistema clasificador estadístico de aprendizaje entrenado con una cohorte de muestras que comprende muestras sanas, muestras con SII, muestras con EII y/o muestras de celiaquía.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el paso (a) comprende además detectar la presencia o nivel de al menos un marcador diagnóstico seleccionado de entre el grupo que consiste en un factor de crecimiento, anticuerpos anti-neutrófilos, anticuerpos anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA), anticuerpos antimicrobianos, lactoferrina, anticuerpos anti-transglutaminasa tisular (tTG), lipocalina, metaloproteinasas de matriz (MMP), inhibidor tisular de la metaloproteinasa (TIMP), alfa-globulina, proteína fragmentadora de actina, proteína S100, fibrinopéptido, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), taquiquinina, grelina, neurotensina, hormona de liberación de corticotropina, y combinaciones de los mismos en dicha muestra.

3. El método de la reivindicación 1, en el que el paso (a) comprende además detectar la presencia de una citoquina seleccionada de entre el grupo que consiste en IL-8, IL-1 β , leptina, osteoprotegerina (OPG), MIP-3 β , GRO α , CXCL4/PF-4, CXCL7/NAP-2, y combinaciones de los mismos.

4. El método de la reivindicación 2, en el que dicho factor de crecimiento se selecciona de entre el grupo que consiste en factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), anfieregulina (SDGF), y combinaciones de los mismos.

5. El método de la reivindicación 2, en el que dichos anticuerpos anti-neutrófilos se seleccionan del grupo que consiste en anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos (ANCA), anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos perinucleares (pANCA), y combinaciones de los mismos.

6. El método de la reivindicación 2, en el que dicho ASCA se selecciona de entre el grupo que consiste en ASCA-IgA, ASCA-IgG, y combinaciones de los mismos.

7. El método de la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo antimicrobiano se selecciona de entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-proteína C de la membrana externa (anti-OmpC), anticuerpo anti-flagelina, anticuerpo anti-I2, y combinaciones de los mismos.

8. El método de la reivindicación 2, en el que

a) dicha lipocalina se selecciona de entre el grupo constituido por lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL), un complejo de NGAL/MMP-9, y combinaciones de los mismos;

b) dicha MMP es MMP-9;

c) dicha TIMP es TIMP-1; y

d) dicha globulina alfa se selecciona entre el grupo que consiste en alfa-2-macroglobulina, haptoglobina, orosomucoide, y combinaciones de los mismos.

9. El método de la reivindicación 1, en el que el paso (a) comprende además detectar la presencia de un marcador de diagnóstico seleccionado del grupo de BDNF, NGAL, GRO α , IL-1 β , TIMP-1, ASCA-IgA, anti-CBIR-1 anticuerpo flagelina, ANCA, tTG y combinaciones de los mismos.

10. El método de la reivindicación 1, en el que dicho perfil de marcadores diagnósticos se determina detectando la presencia o nivel de al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis marcadores de diagnóstico.

11. El método de la reivindicación 1, en el que dicho método comprende determinar dicho perfil de marcadores diagnósticos en combinación con un perfil de síntomas, en el que el perfil de síntomas se determina mediante la identificación de la presencia o la gravedad de al menos un síntoma en dicho individuo; y se clasifica dicha muestra como una muestra con SII o muestra sin SII utilizando un algoritmo basado en dicho perfil de marcadores diagnósticos y dicho perfil de síntomas.

12. El método de la reivindicación 1, en el que dicha muestra se selecciona entre el grupo que consiste en suero, plasma, sangre entera y heces.

- 5 13. El método de la reivindicación 1, en el que dicho algoritmo comprende un algoritmo estadístico, como un sistema clasificador estadístico de aprendizaje, en el que dicho sistema clasificador estadístico de aprendizaje se selecciona de entre el grupo que consiste en un bosque aleatorio, árbol de clasificación y regresión, árbol de decisión, red neural, máquina de vectores de soporte, modelo de detección de interacción automática general de ji cuadrado, árbol interactivo, *spline* de regresión multiadaptativa, clasificador de aprendizaje automático y combinaciones de los mismos.
- 10 14. El método de la reivindicación 1, en el que dicho método comprende además la clasificación de dicha muestra sin SII como una muestra normal, de enfermedad inflamatoria intestinal (EII) o sin EII.
15. El método de la reivindicación 1, en el que dicho método comprende adicionalmente la clasificación de la muestra de SII como una muestra de SII-estreñimiento (SII-C), SII-diarrea (SII-D), SII-mixto (SII-M), SII-alternado (SII-A) o SII post-infeccioso (SII-PI).

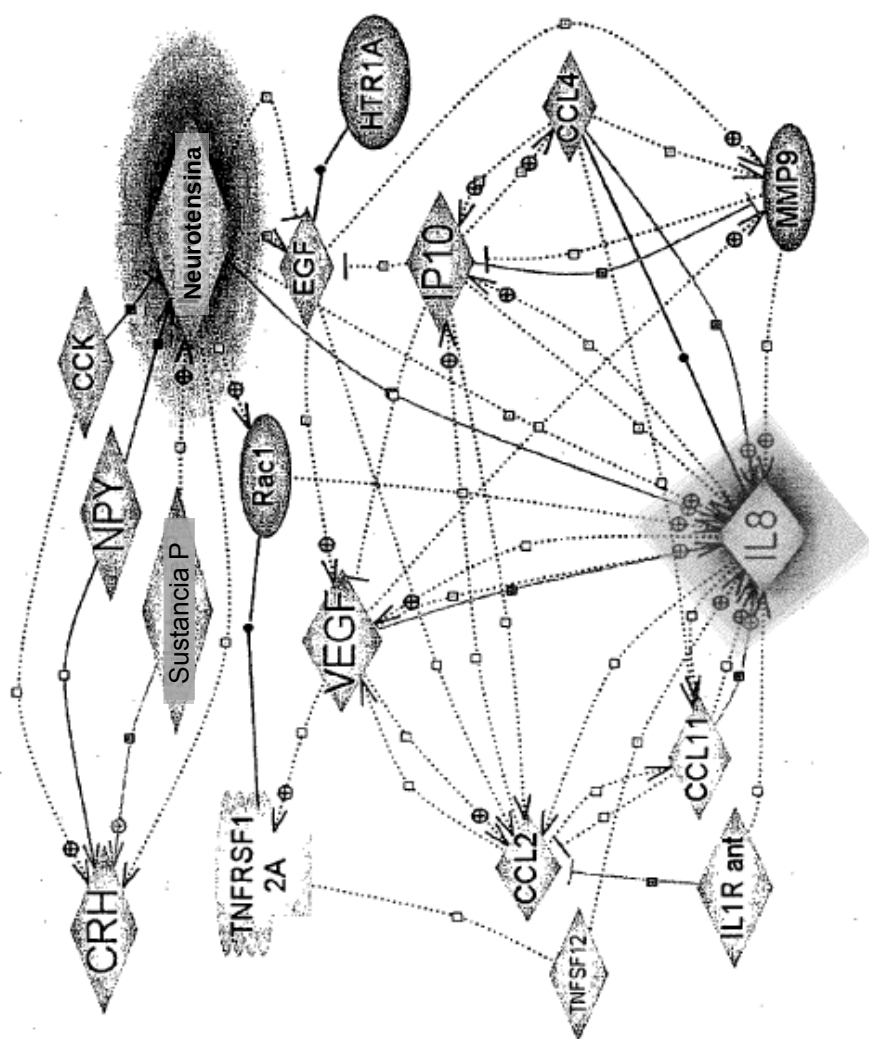


FIG. 1

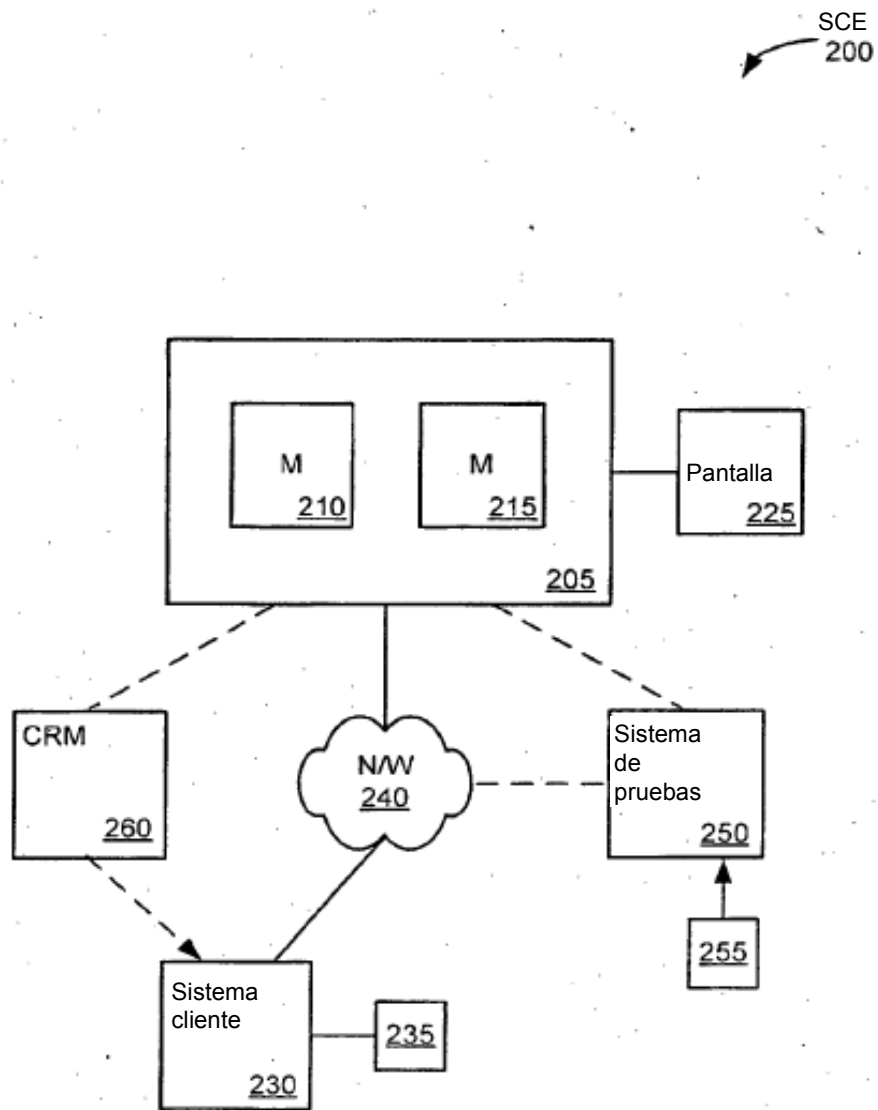


FIG.2

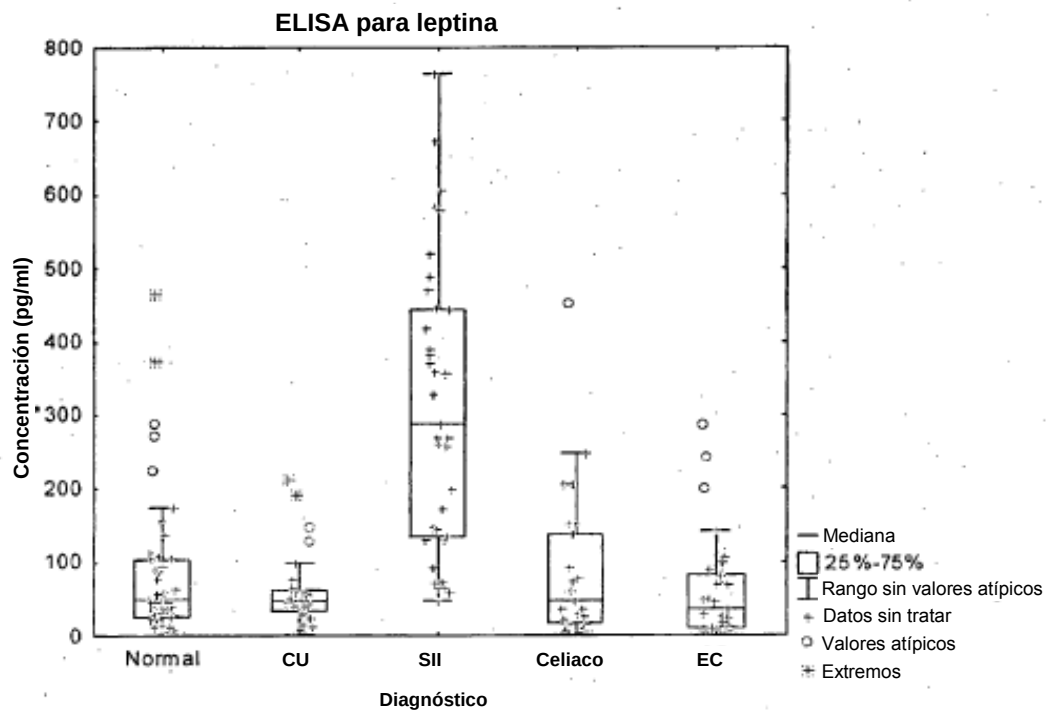
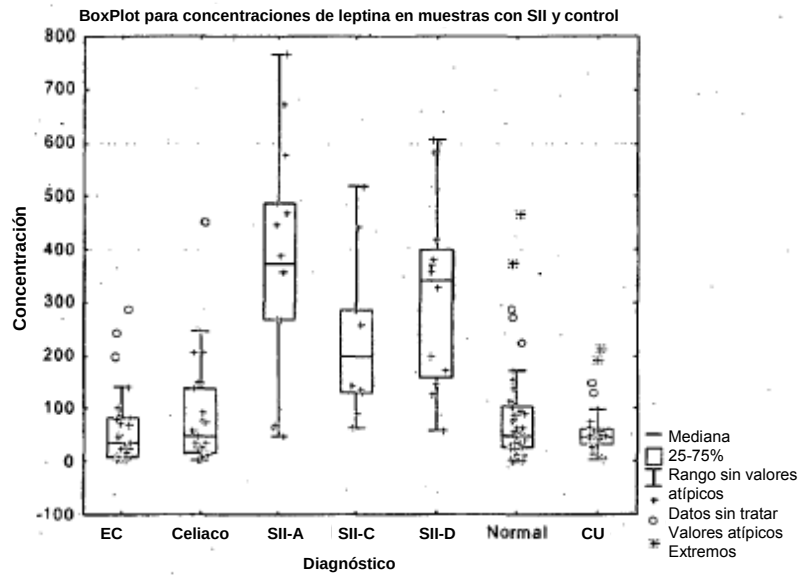


FIG.3

A



B

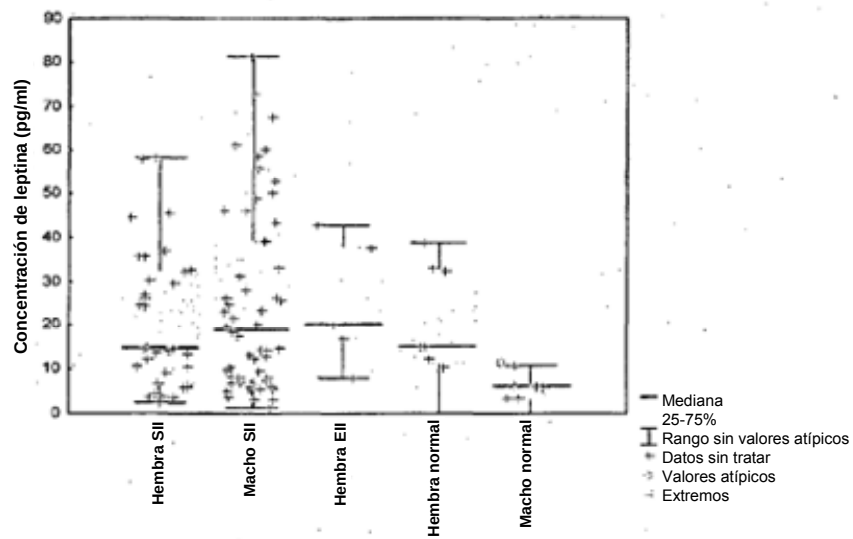


FIG. 4

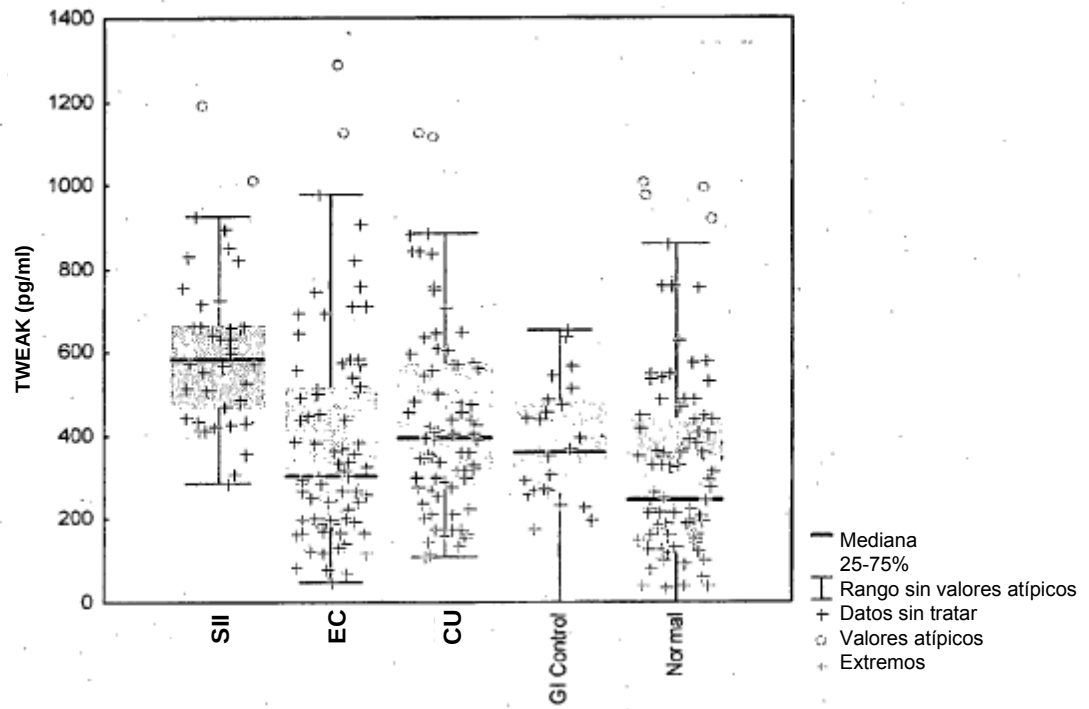


FIG.5

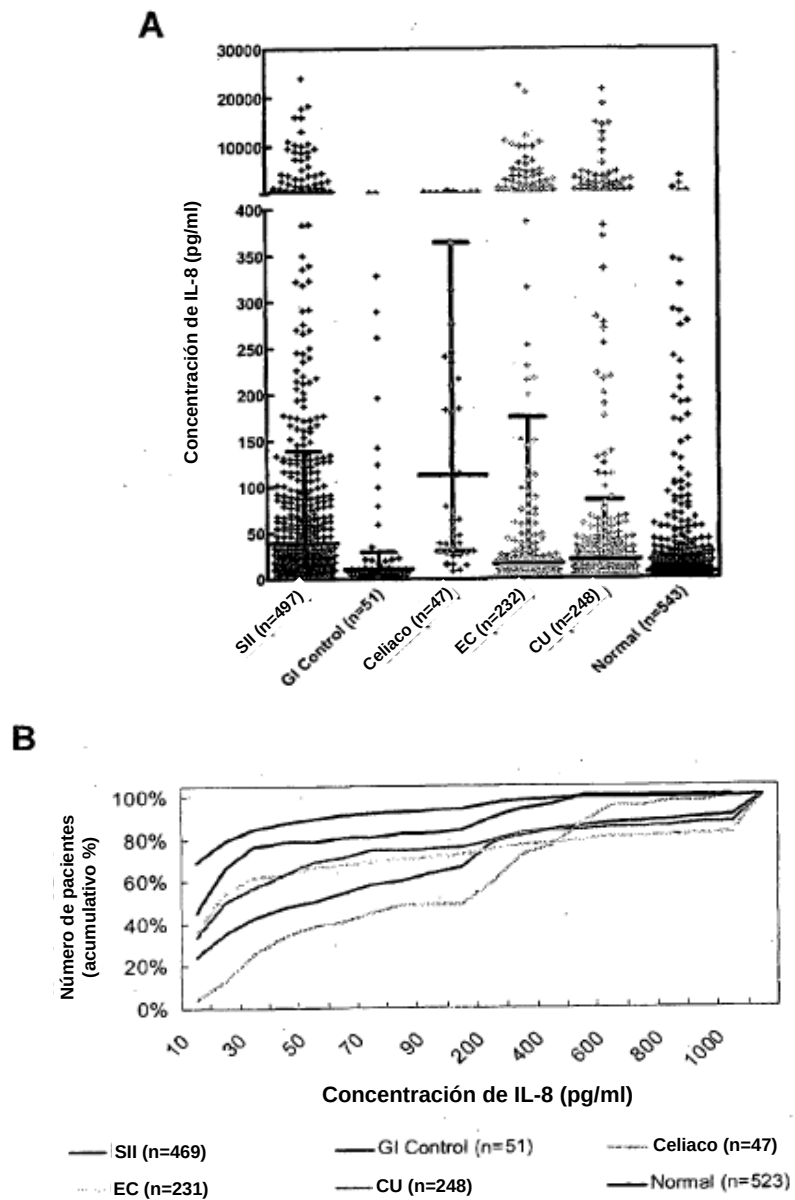


FIG. 6

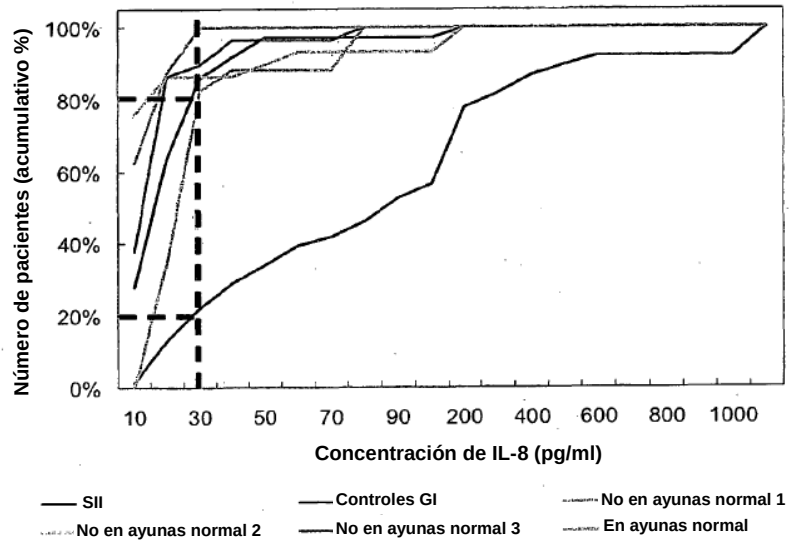


FIG.7

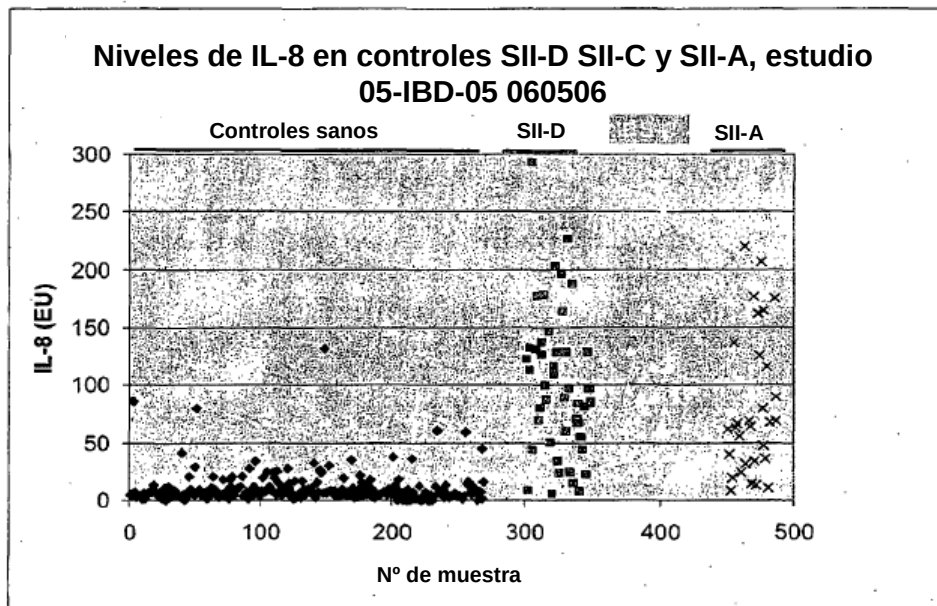


FIG.8

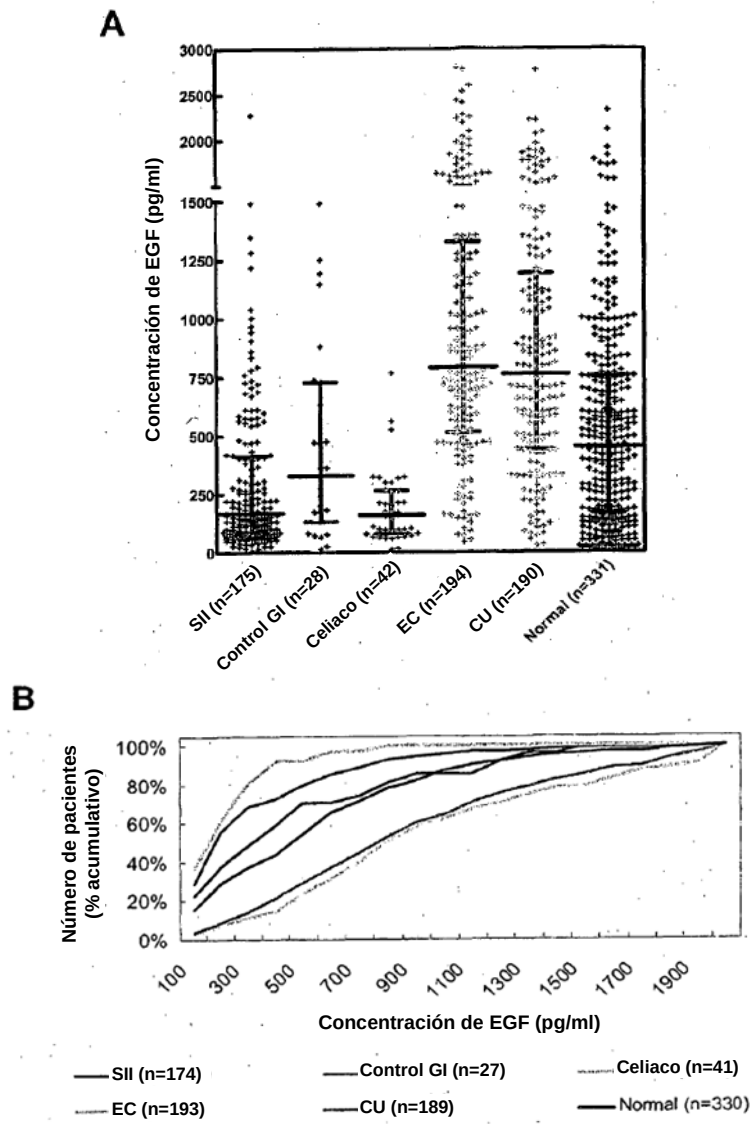


FIG. 9

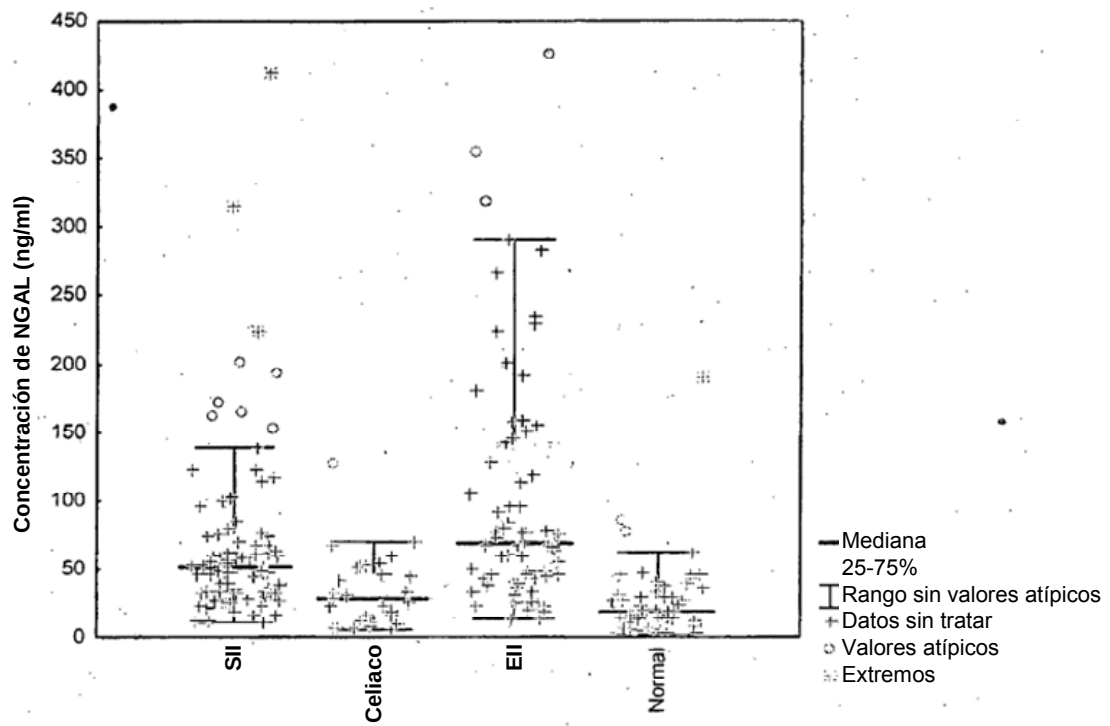


FIG.10

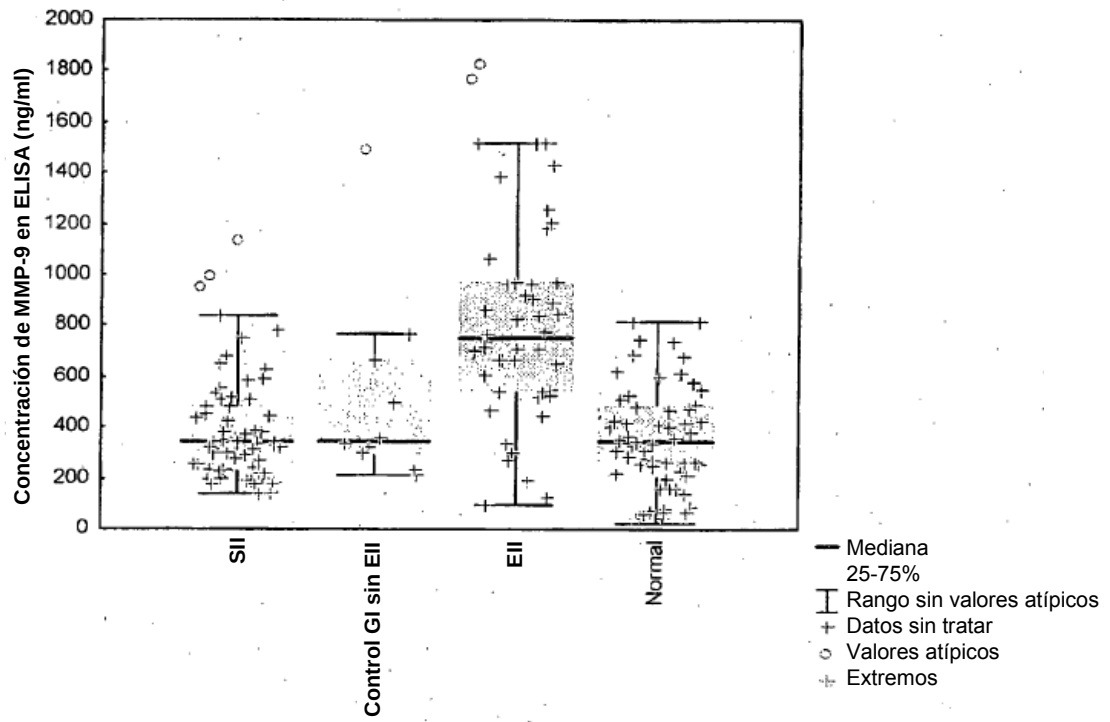


FIG.11

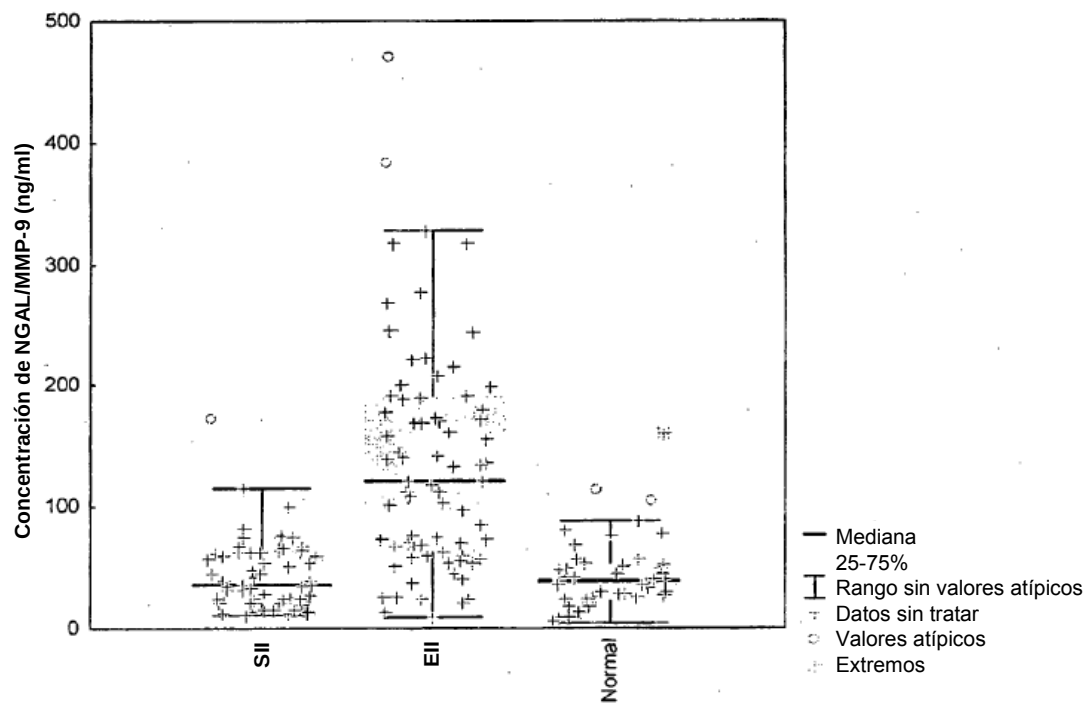


FIG.12

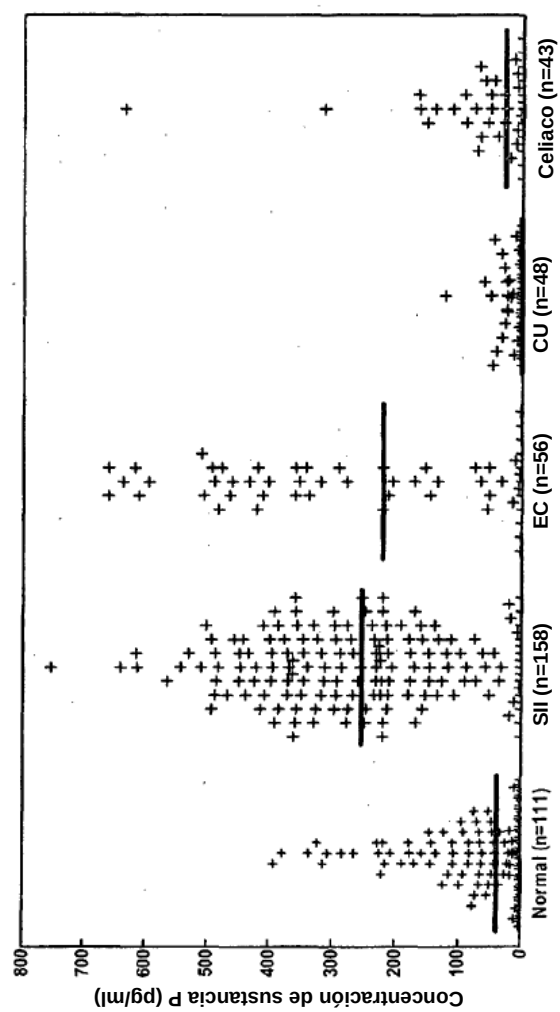


FIG.13

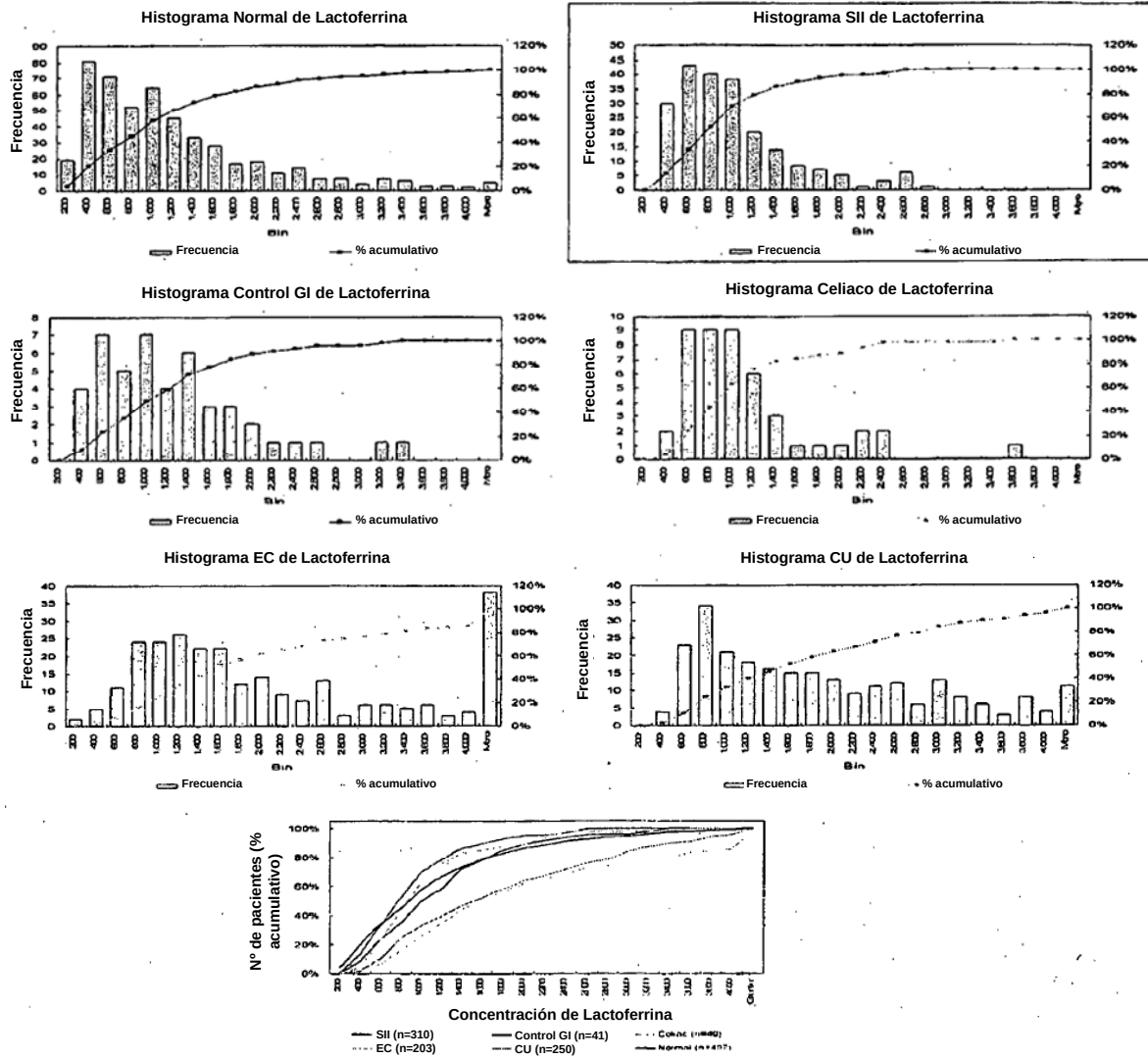


FIG.14

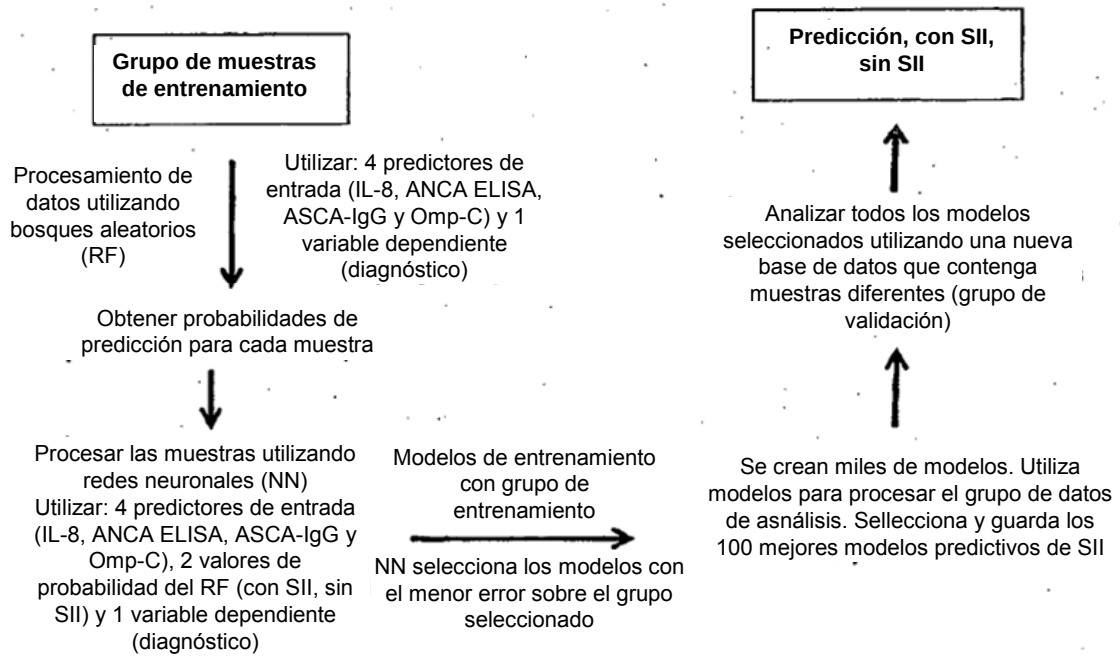


FIG.15

Exactitud de predicción de SII 060106

Datos de 060106 para IL-8

Valores de ELISA IL-8 > 800 EU proporcionaron el valor de 800 EU

				Modelo
TN	99	Sensibilidad a SII	75%	22
FN	26	Especificidad a SII	98%	22
TP	79	VPP a SII	98%	22
FP	2	VPN a SII	79%	22
TN	86	Sensibilidad a SII	86%	38
FN	15	Especificidad a SII	85%	38
TP	90	VPP a SII	86%	38
FP	15	VPN a SII	85%	38
TN	85	Sensibilidad a SII	87%	39
FN	14	Especificidad a SII	84%	39
TP	91	VPP a SII	85%	39
FP	16	VPN a SII	86%	39

Matriz de confusión		
	0	-1
0.22	99	26
-1.22	2	79
0.38	86	15
-1.38	15	90
0.39	85	14
-1.39	16	91

Modelo	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
22	75%	98%	98%	79%
38	86%	85%	86%	85%
39	87%	84%	85%	86%

	Nº de muestras
Total	735
Controles sanos	333
SII	402

FIG.16

Perfil: MLP 3:3-10-3:1 Índice: = 116
Rend. entrenamiento: = 1.000000 , Rend. Selec.: = 1.000000 , Rend. prueba: = 1.000000

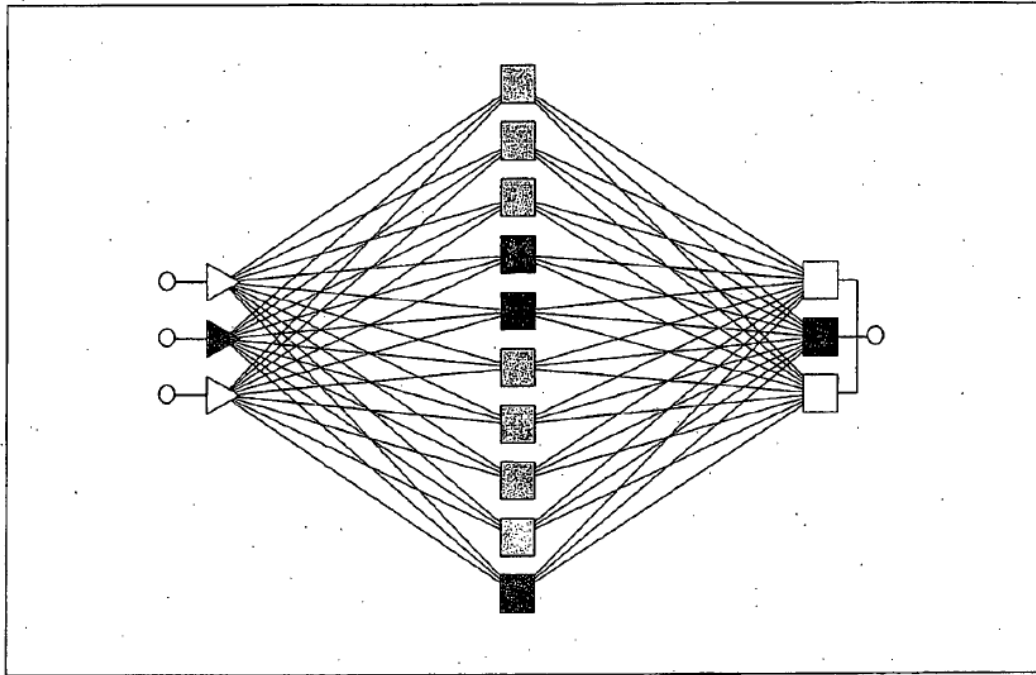


FIG.17

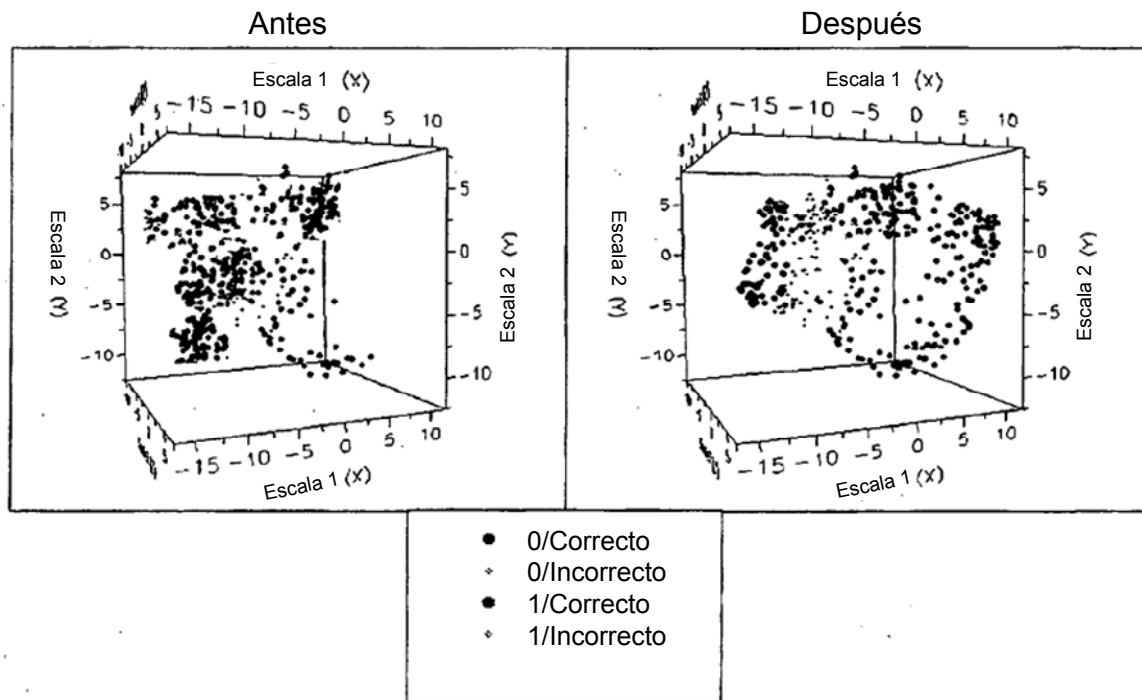


FIG.18

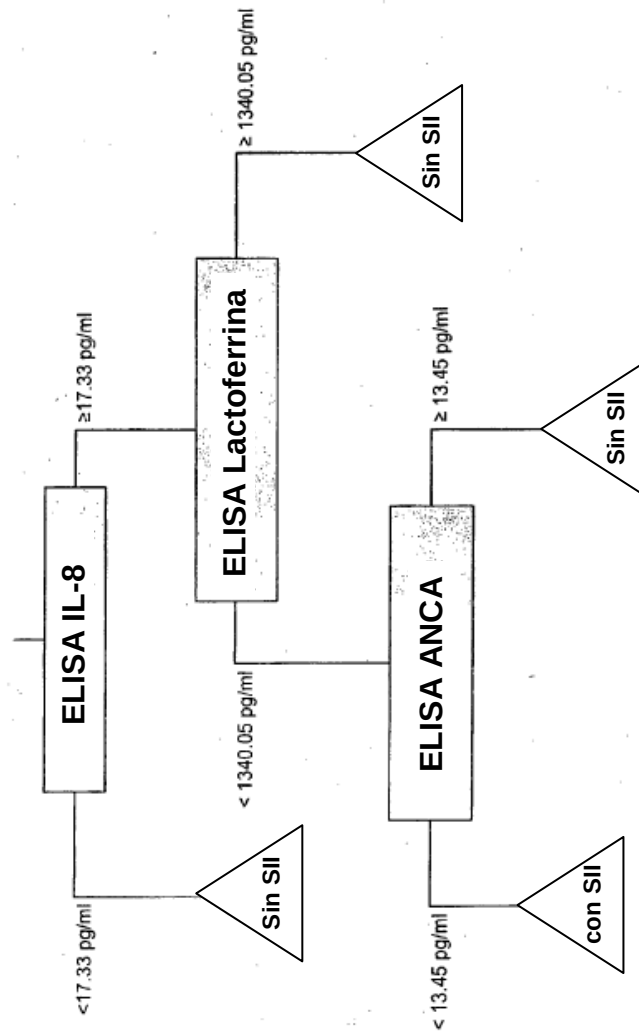


FIG.19