

**DESARROLLO DE UNA TÉCNICA RÁPIDA DE
DIAGNÓSTICO EN ATENCIÓN PRIMARIA
PARA *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

- Trabajo de fin de grado de Medicina -

Autor: Antonio Ramírez Fernández

Tutor: Dr. Miquel Sabrià Leal

Unidad de Enfermedades Infecciosas del HUGTiP

Curso 2017 – 2018

Universitat Autònoma de Barcelona

UD Germans Trias i Pujol

Agradecimientos

Me gustaría agradecer, antes de nada, a todas aquellas personas que me han aconsejado, ayudado e invertido horas de su tiempo para la elaboración de este proyecto.

Especialmente a:

Dr. Miquel Sabrià Leal, tutor de este proyecto e Investigador principal en el Servicio de Investigación de Legionella y Enfermedades Infecciosas del IGTP.

Dra. Sara Quero Blanca, Investigadora Post-doctoral en el Servicio de Investigación de Legionella y Enfermedades Infecciosas del IGTP.

Índice

1. Resumen y Abstract	pág. 4.
2. Introducción	pág. 5
3. Hipótesis	pág. 11
4. Objetivos	pág. 11
a) Primarios	
b) Secundarios	
5. Material y métodos	pág. 12
a) Diseño del estudio	pág. 12
b) Ámbito del estudio: Centros participantes	pág. 12
c) Metodología	pág. 13
1. Pacientes y grupo control	pág. 13
2. Recogida de muestras	pág. 14
3. Desarrollo de la prueba	pág. 14
d) Plan de trabajo	pág. 16
e) Explotación estadística	pág. 17
f) Justificación y aplicabilidad	pág. 18
6. Plan de difusión	pág. 19
7. Limitaciones y posibles soluciones	pág. 20
8. Memoria económica	pág. 21
9. Aspectos éticos	pág. 22
10. Anexos	pág. 23
11. Bibliografía	pág. 26

1. Resumen

La tuberculosis sigue siendo una enfermedad de gran relevancia a nivel mundial, siendo la novena causa de muerte y la primera entre las enfermedades infecciosas. La OMS ha propuesto una hoja de ruta para la erradicación de esta enfermedad, la Estrategia Fin TBC 2035.

En Cataluña, la incidencia es aún bastante importante por lo que tanto a nivel internacional como a nivel catalán las instituciones recomiendan desarrollar nuevas técnicas de diagnóstico y tratamiento que posibiliten formas más eficientes de enfrentar esta patología.

En la actualidad el “gold standard” para el diagnóstico de TBC sigue siendo la observación de las micobacterias en cultivos de muestras clínicas. En las últimas décadas, se han desarrollado nuevas técnicas de diagnóstico; como la ampliación de ácidos nucleicos, la prueba de Matoux o el test de IFN-gamma; pero su alto coste, la necesidad de equipos microbiológicos específicos o la demora en los resultados hacen que aún haya ciertas carencias en cuanto a diagnóstico rápido.

El objetivo de este proyecto es la mejora del diagnóstico mediante el desarrollo de una técnica diagnóstica rápida a nivel ambulatorio que evite demoras en la detección de la TBC y minimice los costes relacionados con el empleo de técnicas más complejas.

Abstract

Tuberculosis remains a highly relevant disease worldwide, being the ninth cause of death and the first among infectious diseases. The WHO has proposed a route for the eradication of this disease, the TBC 2035 End Strategy.

In Catalonia, the incidence is still quite important. For this reason, at international and Catalan level, institutions recommend development of new diagnosis and treatment techniques for a more efficient way of dealing with this pathology.

Currently, the "gold standard" for diagnosing TBC remains the observation of mycobacteria in cultures from clinical samples. In recent decades, new diagnostic techniques have been developed; such as nucleic acid amplification, the Matoux test or the IFN-gamma test; but its high cost, the need for specific microbiological equipment or the delay in results mean there are certain lacks in terms of rapid diagnosis.

The objective of this project is to improve diagnosis by developing a rapid diagnostic technique at ambulatory level that avoids delays in the detection of TBC and minimizes the costs related to the use of more complex techniques.

2. Introducción

Epidemiología

La tuberculosis (TBC) es una de las enfermedades más antiguas que se conocen y actualmente sigue siendo una de las causas más importantes de enfermedad y muerte en muchos países, por lo que supone un importante problema de salud pública a nivel mundial. A pesar de los progresos logrados en las últimas décadas en cuanto a tratamiento y profilaxis contra esta enfermedad se siguen evidenciando marcadas diferencias regionales y nacionales que provocan que la TBC sea la novena causa de muerte a nivel mundial y la primera de entre las enfermedades infecciosas (1).

En 2016 más de 10 millones de personas contrajeron la TBC de las cuales el 56% viven en: India, Indonesia, China, Filipinas y Pakistán (1). Ese mismo año provocó hasta 1,3 millones de muertes en personas VIH-negativas¹ (2). También desde la OMS se recalca que la mayoría de muertes por TBC podrían evitarse con un diagnóstico precoz y un tratamiento apropiado (2).

¹ En personas VIH-positivas que mueren por TBC, la causa de muerte se clasifica como VIH según el Sistema de Clasificación Internacional CIE-10.

La OMS ha desarrollado un plan específico para su erradicación, la Estrategia Fin TBC 2035, pretendiendo reducir el número de muertes en un 95% y la tasa de incidencia en un 90% entre 2015 y 2035. Entre los pilares principales del proyecto destaca el desarrollo de técnicas de diagnóstico rápido para la mejor prevención, detección y tratamiento de la enfermedad (2,3).

Al mismo tiempo, el informe de la Agencia de Salud Pública de Cataluña del año 2016 sobre la TBC(4) destaca que a pesar de los avances y medidas llevadas a cabo para el control de esta enfermedad, la incidencia en el territorio catalán es todavía moderadamente alta. En 2016 el 45,7% de los casos en Cataluña correspondieron a personas recién llegadas. Entre esta población, la tasa de TBC es cuatro veces superior que en personas autóctonas, hecho posiblemente relacionado con la procedencia de las personas migrantes de países endémicos, sobre todo India, China y Pakistán. Esto, entre otros factores, ocasiona que la distribución de casos no sea homogénea en todo el territorio, concentrándose el 67,3% de los casos en la Región Sanitaria de la provincia de Barcelona y el 26% en la ciudad de Barcelona.

Patogenia

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa transmisible curable y prevenible. Está causada por *Mycobacterium tuberculosis*, es de evolución crónica y se caracteriza por la formación de granulomas. Su localización preferente es el pulmón, aunque puede afectar a cualquier órgano. La vía habitual de transmisión es la inhalación de aerosoles procedentes de un paciente con tuberculosis pulmonar (5).

Diagnóstico

El diagnóstico de TBC se basa en una variedad de pruebas que se han ido desarrollando en estos últimos años. Además de la clara importancia de los signos y síntomas clínicos

y pruebas de imagen, el diagnóstico de certeza se realiza mediante el cultivo y aislamiento de *M. tuberculosis* a partir de muestras clínicas. El problema con este microorganismo es su ritmo de crecimiento, que es lento, con un periodo de generación de entre 15-20 horas (5) comparado con la hora aproximadamente que necesitan la mayoría de bacterias comunes. Además, el crecimiento visible se demoraría hasta 3-8 semanas, lo que retrasa el diagnóstico de certeza e influye en cómo se afronta a la enfermedad.

Las últimas guías sobre el diagnóstico señalan el uso, siempre que sea posible, de al menos 3 muestras seriadas representativas de la localización clínica. La baciloscopia y el cultivo con medios líquidos deben realizarse en todos los casos. Las técnicas de amplificación genética son coadyuvantes en la sospecha moderada o alta de tuberculosis(6).

- **Técnicas de screening y sospecha:**

- Prueba de PPD (Mantoux, tuberculina)**

La prueba de la tuberculina se realiza mediante la técnica de Mantoux y es ampliamente utilizada, tiene un bajo coste económico y su realización es sencilla. Se basa en la inoculación de un derivado proteico purificado intradérmico para el estudio de la reacción contra el mismo.

La prueba puede presentar falsos positivos debido a la sensibilización del sistema inmune causada por la administración previa de la vacuna BCG o de la exposición a micobacterias no tuberculosas. También se pueden obtener falsos negativos en las personas con alteraciones del sistema inmunitario, en los casos de tuberculosis diseminada y en niños menores de 6 meses.

Por otro lado, la lectura de la induración producida se debe realizar a las 48-72 horas dando lugar también a gastos indirectos tanto para el paciente, que debe asistir varios días al hospital, como del personal sanitario necesario para este seguimiento.

Test de IFN-gamma (Interferon Gamma Release Assays o IGRAs)

Es una técnica de inmunodiagnóstico que consiste en la detección in vitro de las células T del paciente sensibilizadas contra *M. tuberculosis*. Se lleva a cabo mediante la estimulación de la muestra del paciente contra antígenos específicos del microorganismo valorando la aparición de interferón gamma mediante un ELISA.

Aunque es más sensible y específica que la PPD, es una prueba de elevado coste. Esto junto con las estrictas exigencias a la hora de la recogida y procesamiento de la muestra hacen que no haya supuesto un avance significativo en la práctica diaria.

- **Técnicas de confirmación diagnóstica:**

Examen microscópico directo

El *M. tuberculosis* es un microorganismo ácido-alcohol resistente por lo que para su examen directo necesita del uso de tinciones específicas como la Ziehl-Nielsen. Este tipo de técnica normalmente se realiza en muestras de esputo del paciente², dando resultados en el día con una base técnica bastante simple.

Sin embargo, son necesarios 10.000 microorganismos/ml de esputo para considerarlo positivo (siendo menos sensible que el cultivo). Además, la dificultad en la toma de muestras útiles, la no especificidad para *M. tuberculosis* frente a otras micobacterias, unido a la necesidad de procesar la muestra en un laboratorio de microbiología, provocan que no sea una prueba de gran rendimiento.

² Observando bacilos arrosariados de unos 2-4 µm de largo y 0,2-5 µm de ancho, dispuestos en paralelo o por parejas en forma de V.

Ampliación de ácidos nucleicos (PCR)

Es una prueba de diagnóstico directo sobre muestra clínica, tiene alto valor diagnóstico y efectividad. Se basa en la amplificación de un fragmento de ADN o ARN ribosómico del microorganismo para así poder identificarlo. De esta prueba destaca su rapidez comparada con el resto, ya que podría aportar un resultado en el día y su sensibilidad es intermedia entre cultivo y examen directo.

No obstante, es una prueba complementaria al diagnóstico clínico, examen directo y cultivo. Requiere técnicas de laboratorio avanzadas, un estricto cumplimiento de los protocolos de laboratorio y el uso de equipos especializados, que por su elevado coste sólo se encuentran en algunos laboratorios microbiológicos.

Cultivo microbiológico

Es el método de referencia para detección de micobacterias en muestras clínicas. Se usan tanto muestras de esputo como de tejido. Primero se somete la muestra³ a procesos de eliminación⁴ de microorganismos no micobacterianos, para luego implantar el inóculo restante en medios como Lowenstein-Jensen o Middlebrook.

A pesar de ser la técnica de referencia por su elevada sensibilidad, el hecho de necesitar un laboratorio microbiológico especializado y la lentitud del crecimiento de las micobacterias hacen que los resultados de la prueba se demoren hasta 3-6 semanas por lo que su uso se limita a la confirmación del diagnóstico clínico o de otra prueba.

³ Muestras estériles como LCR o líquido pleural no deben descontaminarse.

⁴ Con productos como N-acetil-L-cisteína, frente a la cual las micobacterias están bastante protegidas por la pared celular rica en ácidos grasos.

- **Últimos avances:**

Lipoarabinomano (LAM)

En los últimos meses varios equipos de investigadores han presentado estudios, como el de MacLean E. et al(7) o el de Biotech Innovations(8), que señalan la importancia de un componente de la barrera celular de *M. tuberculosis*, el Lipoarabinomano (LAM), un factor de virulencia que puede ser identificado en la orina de los pacientes. En uno de los últimos artículos sobre el tema, el equipo de la Doctora Paris(9) ha corregido algunos de los problemas que tenía en un principio el LAM-test (como la falta de sensibilidad en pacientes inmunocompetentes) usando una tinción que mejora esas deficiencias. Sin embargo, con esta nueva versión el coste de la prueba aumentaría y su aplicabilidad en atención primaria se vería comprometida, siendo necesario el procesamiento de las muestras en laboratorios especializados.

Proteómica y futuro del diagnóstico de *M. tuberculosis*.

La proteómica se basa en el estudio de las proteínas totales (o proteoma) de una célula, microorganismo, tejido o fluido para su caracterización. Considerada el futuro de la Biología Molecular la identificación de este “genoma” de proteínas marcará la punta de lanza para el estudio del sistema biológico a medio y largo plazo. Entre sus futuras utilidades destaca su aplicación en el campo de las enfermedades infecciosas. Gracias a esta técnica se pueden definir mejor los microorganismos y así descubrir nuevas formas de enfrentarse a ellos.

En el caso de la tuberculosis, por ejemplo, ya se han hecho las algunas investigaciones: como en Brandy L. Young et al(10) intentando aplicar el estudio proteómico de muestras de pacientes con TBC o como en Eik Hoffmann et al(11), se estudia la proteómica de *M. tuberculosis* haciendo hincapié en su importancia y futuras implicaciones en cuanto a patogenia y tratamiento.

Conclusión

Teniendo en cuenta las deficiencias de coste y tiempo que presentan las pruebas convencionales, el LAM-test marcará el camino para nuevas formas de afrontar el diagnóstico clínico de TBC. Sin embargo, no soluciona la gran carencia de pruebas rápidas a nivel ambulatorio para tuberculosis.

Por tanto, el nuevo horizonte marcado por las posibilidades del proteoma urinario podría ser un excelente punto de partida para solventar las insuficiencias diagnósticas en atención primaria y poder afrontar de manera más eficiente esta patología.

3. Hipótesis

Usando el proteoma urinario de pacientes con tuberculosis se podrá desarrollar una prueba de diagnóstico rápido, aplicable a nivel ambulatorio.

4. Objetivos

Objetivo principal

Identificar marcadores en orina (obtención de muestra no invasiva) para la creación de un test antigénico de diagnóstico aplicable a nivel de atención primaria.

Objetivos secundarios

- Determinar sensibilidad, especificidad, valores predictivos y aplicabilidad del test diagnóstico en orina.
- Estudio de coste/efectividad del cribado en la población de riesgo mediante dicha técnica.

5. Material y métodos

A. Diseño del estudio

Se realizará un estudio de validación de técnica diagnóstica mediante el cual se compararán los resultados de una nueva prueba, desarrollada durante el proyecto, con los obtenidos por el test de referencia. En el caso de la TBC se considera el uso de un Gold Standard imperfecto que incluirá: cultivo, examen directo y PCR en pacientes TBC-positivos y PPD e IGRA en pacientes TBC-negativos.

B. Ámbito del estudio: Centros participantes

Se realizará un estudio multicéntrico en cinco centros participantes: un centro de investigación y cuatro centros de atención primaria (CAPs)

Por un lado, el Instituto de Investigación Germans Trias i Pujol (IGTP), donde se realizará el grueso del proyecto (conservación y procesado de muestras y desarrollo de la técnica diagnóstica, entre otros).

Por otro lado, cuatro Centros de Atención Primaria (CAPs)⁵ con tasas importantes de precariedad social y alto porcentaje de población migrante de China, India, Pakistán y Filipinas⁶: Centro de Asistencia Primaria Barceloneta (Ciutat Vella), Centro de Atención Primaria Sants (Sants), Centro de Atención Primaria Sant Roc (Badalona) y Centro de Atención Primaria Fondo (Santa Coloma de Gramanet). En estos cuatro CAPs se realizará la selección de participantes y la recogida de muestras.

⁵ Estos CAPs pertenecen a 2 zonas de Cataluña con alta prevalencia de población migrante de países endémicos para la tuberculosis: Barcelonés Nord y Ciudad de Barcelona según el Informe de Vigilancia Epidemiológica sobre la TBC en Cataluña en 2016(4).

⁶ Fuente: IDESCAT y Ayuntamiento Barcelona.

C. Metodología

1) Pacientes y grupo control

Se esperan incluir total de 150 participantes que serán informados de las características del estudio y habrán firmado el consentimiento informado. Se reclutarán pacientes hasta obtener tres grupos de 50 participantes cada uno, según las siguientes características.

Clasificación de grupos de estudio:

- **Grupo A (TBC-positivos):** pacientes con signos y síntomas de tuberculosis que cuenten con confirmación diagnóstica mediante examen por microscopía directa, cultivo microbiológico o PCR.
- **Grupo B (TBC-negativos):** pacientes con signos y síntomas de tuberculosis en los que se descarte la enfermedad tuberculosa mediante test de PPD o IGRA negativos
- **Grupo C (Sanos-control):** Pacientes sin ningún tipo de patología infecciosa, alteración del sistema inmune y que no convivan con los sujetos clasificados en los grupos A y B. Se reclutarán sujetos de las mismas poblaciones que los pacientes de los otros dos grupos intentando que estos tengan características similares.

Criterios de inclusión: 1) edad entre 18-55 años, 2) aceptación del consentimiento informado, 3) comprensión del motivo y características del estudio, 4) signos y síntomas clínicos para TBC +/- radiografía de tórax⁷. Ver anexo 1.

Criterios de exclusión: 1) haber recibido o estar recibiendo profilaxis/tratamiento antituberculoso, 2) tener alguna enfermedad que comporte compromiso del sistema inmune (VIH-positivos, ancianos, niños, etc.), 3) ser familiar o conviviente en la misma residencia que pacientes en estudio o en tratamiento/profilaxis para TBC.

⁷Criterio de inclusión 4: sólo necesario para participantes de los grupos TBC-positivos o TBC-negativos.

2) Recogida de muestras:

La búsqueda de biomarcadores se realizará en orina, siendo ésta una muestra obtenida de manera rápida, no invasiva y fácil de manejar en la consulta de atención primaria.

Las muestras de orina fresca de cada paciente se conservarán a -20°C en los centros de origen y se enviarán, preferentemente antes del transcurso de 3 días desde su recogida, al Instituto de Investigación Germans Trias y Pujol (IGTP) donde se conservarán a -80°C para el estudio de los biomarcadores.

Las muestras de los grupos TBC-positivos y TBC-negativos se recogerán antes de que se lleve a cabo el tratamiento o profilaxis de los mismos (ya sea para TBC o para otras patologías), para evitar que estos procedimientos interfieran en los resultados del estudio.

Las muestras se conservarán durante el tiempo necesario hasta que se lleve a cabo el diagnóstico de confirmación de cada paciente. Una vez se confirme o se descarte la enfermedad se agruparán las muestras en cada uno de los grupos: TBC-positivos con cultivo, examen directo o PCR positivos; TBC-negativos con PPD e IGRA negativos.

Las muestras de pacientes sanos se clasificarán directamente como grupo control.

3) Desarrollo de la prueba diagnóstica:

Identificación de Biomarcadores.

En el servicio de proteómica del CRG se llevará a cabo el análisis de 5 orinas de cada grupo para la realización de los proteomas. Cada orina seleccionada para el análisis proteómico se procesará para la purificación y concentración de proteínas mediante su precipitación con metanol-cloroformo. Cada extracto de proteínas se cuantificará mediante el ensayo de Bradford (BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El proteoma de cada orina se caracterizará en el espectrómetro de masas Orbitrap en el servicio de proteómica del CRG.

Los datos obtenidos se procesarán con el programa informático MaxQuant utilizando los valores por defecto y las bases de datos de proteínas de humanos y de *M. tuberculosis*. La valoración de la expresión diferencial y los análisis estadísticos se realizará en el programa Perseus aplicando T-test y ANOVA en una dirección.

Se determinarán como potenciales biomarcadores aquellos que revelen diferencias significativas de expresión entre los grupos y que estén presentes en todas las muestras del grupo A y ausentes en el resto de muestras. De entre los potenciales biomarcadores se escogerán 3 para proceder a su validación.

Validación de biomarcadores

Para la validación de estos biomarcadores, se producirán *in vitro* las proteínas recombinantes de los biomarcadores seleccionados. Estas proteínas recombinantes se utilizarán para la producción de anticuerpos monoclonales frente a las mismas y como referencia para la validación de los anticuerpos. La producción de proteínas recombinantes y anticuerpos monoclonales se realizará en el servicio de anticuerpos de la Universidad Autònoma de Barcelona.

Los anticuerpos serán validados en los laboratorios de investigación de la Fundación IGTP, mediante ELISA. Se testará la reactividad de cada anticuerpo frente a la proteína recombinante y frente a las orinas utilizadas para búsqueda de biomarcadores. Se seleccionarán aquellos anticuerpos con una sensibilidad y especificidad elevada (aquellos anticuerpos que sólo den señal en las muestras de orina del grupo A, y no den señal en el resto de orinas).

Los anticuerpos seleccionados se validarán con las 150 muestras de orina y aquellos que obtengan mejor sensibilidad y especificidad serán los anticuerpos seleccionados para la creación de un test rápido en consulta para el diagnóstico de la TBC.

Diseño de un test de diagnóstico rápido para consulta

Se contratará una empresa externa dedicada al diseño de dispositivos médicos de fácil manejo para el diseño, producción y valoración del kit para el diagnóstico rápido y sencillo de la TB por inmunocromatografía.

D. Plan de trabajo

Duración del proyecto:

La duración del proyecto será de 4 años. (ver Anexo 2)

Cronograma:

- **Fase I: Cribado de pacientes y recogida de muestras.** Reclutamiento de pacientes seleccionados a través de los criterios de inclusión y exclusión. Serán separados en tres grupos según el diagnóstico sea: pacientes con diagnóstico TBC-positivo, pacientes con diagnóstico TBC-negativo y pacientes sanos. De cada paciente se recogerán una muestra de orina para estudio de la enfermedad y búsqueda de biomarcadores. Esta fase durará 10 meses.

- **Fase II: Desarrollo de la técnica de diagnóstico rápido.** A partir de las muestras se llevará a cabo el estudio de biomarcadores en orina y se procederá al desarrollo de la nueva técnica de diagnóstico precoz ambulatoria, que se denominará TRU-test (Tuberculosis Rapid Urine test). Esta fase durará 2 años.

- **Fase III: Validación de la nueva técnica.** Se contrastarán los resultados obtenidos por las técnicas ya existentes (microscopía, cultivo y pruebas moleculares en el grupo de TBC-positivos y PPD e IGRA's en el grupo de TBC-negativos) con la nueva técnica desarrollada. Esta fase durará 2 meses.

▪ **Fase IV: Desarrollo e implementación de estrategias en Salud Comunitaria.**

Una vez desarrollado el proyecto hará falta llevarlo a la práctica clínica. Esto se conseguirá mediante la creación y puesta a punto de planes para implantación de la prueba primero en los centros participantes y posteriormente en otras regiones sanitarias o incluso a nivel internacional. Además, los objetivos de la Estrategia Fin TBC 2035 se beneficiarán de la difusión del uso de la técnica. Esta fase durará 1 año.

E. Plan explotación estadística: Análisis de datos

Variables que estudiar:

- Sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos.
- Gastos directos, gastos indirectos.
- Tiempo hasta diagnóstico, tiempo hasta tratamiento.

Se estima el tamaño de la muestra mediante el programa GRANMO. Dado el grado de representatividad que se espera lograr en los grupos de análisis se estima una “n” de 150 pacientes.

Para el cálculo de la sensibilidad y especificidad de las diferentes proteínas en orina como posibles biomarcadores, se utilizará como “Gold-standard” imperfecto la combinación de los resultados obtenidos por microscopia directa, cultivo, PCR, PPD e IGRA. La sensibilidad de estos biomarcadores se determinará por el cálculo de las proporciones de positivos correctamente identificados por estas proteínas en comparación con el “Gold-standard” imperfecto. Los valores predictivos positivos y negativos también se calcularán en comparación con el “Gold-standard” imperfecto.

La valoración del coste-efectividad se realizará al final del estudio. Dado que los pacientes de los grupos A y B seguirán el protocolo convencional para TBC, se calculará el porcentaje de pacientes que:

- que hubieran necesitado el uso de diferentes pruebas diagnósticas (gastos directos).
- que serían bacilíferos y no hubieran sido tratados (gastos indirectos).
- no tratados por pérdida en el sistema sanitario (gastos indirectos).

Estos porcentajes se utilizarán para calcular el gasto generado por el circuito habitual de diagnóstico. Los gastos obtenidos se compararán, mediante un análisis por T-student, con los que supondría la implantación de la prueba rápida en el sistema sanitario.

F) Justificación y aplicabilidad

Como ya se comenta en el apartado de introducción del estudio, la tuberculosis es una patología que, a pesar de ser curable y prevenible, aún hoy en día tiene gran importancia tanto a nivel regional como internacional. La OMS, en sus distintas ponencias en cuanto a TBC, remarca la necesidad de técnicas de diagnóstico rápido para poder lograr la erradicación de esta enfermedad. El desarrollo de esta nueva técnica de diagnóstico rápido significaría un gran avance para poder lograr los objetivos expuestos en la estrategia Fin TBC 2035 de la Organización Mundial de la Salud.

Con este estudio se espera desarrollar una técnica de diagnóstico rápido que pueda ser aplicable a nivel ambulatorio. Con ella se facilitará el diagnóstico precoz de la enfermedad disminuyendo el tiempo medio hasta diagnóstico y el tiempo hasta tratamiento. Gracias a estas mejoras se disminuirán las cifras de pacientes bacilíferos promoviendo así la prevención de la enfermedad.

Además, la aplicación de esta técnica en CAPs con alta prevalencia de población procedente de países donde la TBC es endémica, facilitará el acceso a tratamiento a

pacientes que hasta entonces se perdían en el sistema sanitario por barrera idiomática o cultural.

El desarrollo y explotación de la patente a nombre del IGTP dará lugar a ingresos que posibilitarán continuar la investigación en el campo de la TBC y otros ámbitos relacionados. Se crearán puestos de trabajo para el diseño, fabricación y la comercialización del TREU-test.

Con parte de los beneficios obtenidos en Europa y América del Norte se financiarán proyectos de cooperación con China, India, Pakistán y Filipinas, así como otros países donde es endémica la enfermedad.

En cuanto a los resultados esperables por el uso de esta técnica, se podría esperar un ahorro de más de 50 millones de euros al Sistema Sanitario del Estado español(12). Además, mediante la debida implantación a nivel internacional se podrían ahorrar gran parte de los 6900 millones de dólares estadounidenses de los presupuestos que hoy día se destinan a la lucha contra la enfermedad(1).

6. Plan de difusión

En primer lugar, una vez llevado a cabo el estudio, se patentará el TRU-test a nombre del IGTP para su posterior explotación en beneficio del propio IGTP y del sistema sanitario estatal. En segundo lugar, con los resultados obtenidos se realizarán artículos que se publicarán en las principales revistas nacionales e internacionales, tanto de enfermedades infecciosas, neumología o medicina traslacional como: *Archivos de Bronconeumología* - SEPAR, *European Respiratory Journal* - ERS, *Journal of International Translational Medicine*, *Science Translational Medicine*, *JAMA*, etc.

También se llevarán a cabo comunicaciones sobre la nueva técnica en congresos como los del *SEIMC*, *SEPAR*, *International Congress of Translational Medicine*, *International Congress on Infectious Diseases (ICID)*, entre otros.

7. Limitaciones y posibles soluciones

Podrían existir las siguientes limitaciones, éstas y sus posibles soluciones son:

A) Falta de inversión y desarrollo completo de la patente

Para la puesta a punto de este proyecto y su futuro desarrollo será necesaria una inversión de unos 155.000 euros, para conseguirla se podría intentar presentar el proyecto a las respectivas instituciones sanitarias a nivel catalán o estatal. En caso de no obtener la inversión necesaria se podría plantear la explotación privada de la patente creando una Fundación para la TBC o la búsqueda de inversores privados en el campo de la industria farmacéutica, empresas u organizaciones de medicina traslacional o incluso ONG's que trabajen en el ámbito de la tuberculosis.

B) Dificultad de reclutamiento:

En cuanto a las posibles limitaciones a la hora de conseguir los pacientes necesarios para el estudio podrían existir dos posibles escenarios:

Barrera idiomática

Debido a la procedencia de gran parte de la población a estudiar (pacientes migrantes de países endémicos para TBC), podría haber cierta barrera cultural o idiomática, pudiéndose dar el caso de que pocos pacientes migrantes quisieran participar en el estudio. Esto se podría subsanar mediante la realización del consentimiento informado e instrucciones del estudio en otros idiomas (inglés, chino, hindi, urdú, etc.) o en caso de que hubiera población analfabeta, contratando a un traductor que pudiera explicar las características del estudio.

Dispersión de los centros participantes

Los centros seleccionados para el estudio son CAPs de barrios con bastante problemática socio-sanitaria. Estas circunstancias hacen que los medios de asistencia

sanitaria sean a menudo insuficientes, provocando en muchos casos el desbordamiento de los profesionales que en ellos trabajan. Esto podría dar lugar a una falta de interés por parte de los profesionales para implicarse en el proyecto. La solución para atajar este problema podría ser la organización de sesiones de formación para explicar claramente los objetivos del proyecto: recalcando el mínimo coste de tiempo necesario para su realización; concienciando de la gran mejora que significará para los pacientes y para el sistema sanitario en cuanto a diagnóstico, prevención y tratamiento de la tuberculosis y manifestando la posterior inclusión de los profesionales y los centros en las publicaciones que se realicen, así como la participación en congresos y comunicaciones para la difusión del proyecto.

8. Memoria económica

A continuación se detallan el presupuesto esperado de cada fase⁸:

Fase I: Cribado de pacientes y recogida de muestras

- A los cuatro CAPs participantes en la selección de participantes del proyecto, se les dotará con congeladores de -20°C (1.300€/congelador) → 5.200€
- El transporte de las muestras a temperatura a -20C, se harán una media de 2 envíos por semana y CAP durante las 40 semanas (25€/envío) → 8.000€
- Recogida y almacenamiento de muestras: 3€/muestra → 450€

Coste Fase I: 13.650 €

Fase II: Desarrollo de la técnica de diagnóstico rápido

- Servicio de proteómica, comparación de proteomas por MS (Orbitrap), (3.000€/muestra) → 45.000€
- Producción de proteínas recombinantes: (1.700€/proteína) → 5.100€

⁸ En cada uno de los apartados se comprende el uso de material fungible y otros gastos derivados.

- Servicio de producción de Anticuerpos: (7.500€/biomarcador) → 22.500€
- Transferencia de resultados biológicos (desarrollo de patente): 10.000 €

Coste Fase II: 82.600€

Fase III: Validación de la nueva técnica

- Valoración de los resultados de la técnica por ELISA, (6€/muestra) → 900€
- Creación de un test rápido (mediante una empresa externa) → 50.000€

Coste Fase III: 50.900€

Fase IV: Desarrollo e implementación de técnicas de salud comunitaria

- Publicación en revistas: (1.500€/artículo)(13) → 4.500€
- Participación en congresos y comunicaciones → 3.000€

Aunque podrían ser subvencionados por SEPAR y SEIMC como ponentes

Coste Fase IV: 7.500€

Por lo anteriormente expuesto se estima que el presupuesto necesario para la realización del proyecto deberá ser de 154.650€.

9. Aspectos éticos

El proyecto respeta los principios fundamentales de la declaración de Helsinki (18th World Medical Assembly 1964), así como la legislación vigente de investigación biomédica y lo referente a la protección y confidencialidad de datos personales. Este proyecto contará con la aprobación del Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Germans Trias i Pujol. Se solicitará consentimiento informado para proceder a la extracción y conservación de las muestras biológicas. Ver anexo 3.

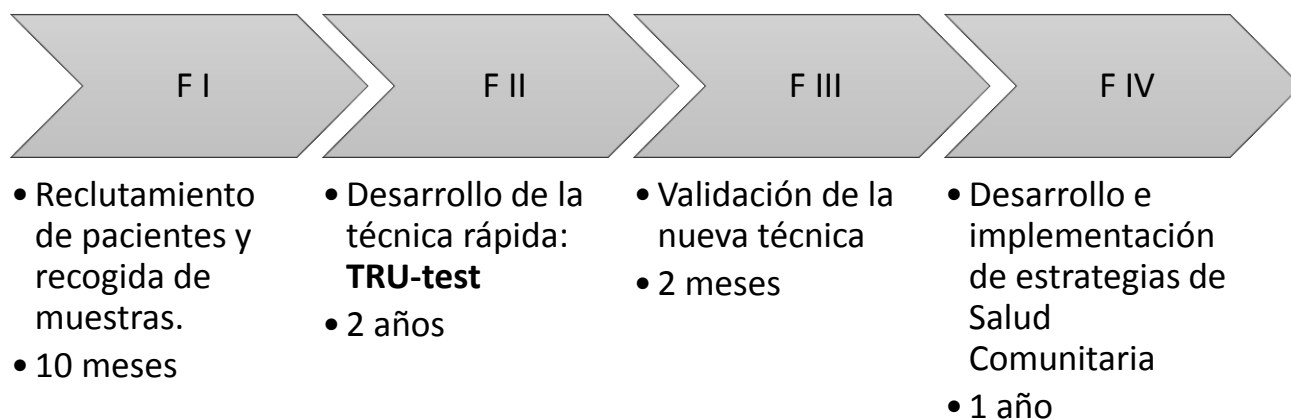
10. Anexos

Anexo 1: Tabla signos y síntomas sospecha tuberculosis.

Clínica (máxima sospecha si <u>>2-3 semanas de evolución</u>)	Radiografía
Tos	Infiltrados u opacidades parenquimatosas
Expectoración <u>hemoptoica</u> (alta sospecha)	Adenopatías (sobre todo para-traqueales e hiliares)
Dolor torácico	Atelectasia segmentaria
Disnea	Derrame pleural
Exploración torácica: - Ruidos o estertores localizados - Asimetrías en ruidos respiratorios	TBC miliar
Sintomatología general: - Febrícula / Fiebre - Sudoración - Astenia - Anorexia - Pérdida de peso injustificada	Hallazgos por TBC reactivada: - Condensaciones parcheadas sin broncograma aéreo - Cavitación única o múltiple - Derrame 2ario a fístula - Tuberculomas - Fibrosis post-tuberculosa

Fuente: Adaptación de protocolo de diagnóstico de sospecha clínico para TBC de la SEPAR

Anexo 2: Tabla cronograma (Las fases aquí representadas podrán solaparse).



Anexo 3: Consentimiento informado

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO

Acepto participar en el estudio:

Desarrollo de una prueba de diagnóstico rápida para *M. tuberculosis*

Yo, _____ con DNI _____

confirmando que he leído detenidamente la información que contiene este consentimiento informado (o me han leído la información). Se me ha explicado en detalle el propósito y los procedimientos de este estudio.

Se me ha proporcionado el tiempo suficiente para revisar la información y realizar todas las preguntas sobre este estudio. Todas mis preguntas sobre el estudio y la participación han sido respondidas. Entiendo que podré preguntar posteriormente si tengo más dudas sobre el estudio y que dispongo de los datos de contacto para ponerme en contacto con el médico del estudio.

Entiendo que mis datos personales pueden revelar mi país de procedencia así como información sobre mi salud, hábitos de vida, viajes o vida sexual.

Acepto que los datos recopilados durante mi participación en el estudio se utilizarán para el objetivo de este estudio y posiblemente también para investigaciones futuras, tal como se describe en el apartado de confidencialidad.

Acepto el envío de estos datos a otros países, siempre que sean tratados en condiciones de estricta confidencialidad y codificados de forma adecuada.

Comprendo perfectamente los contenidos del formulario de consentimiento y acepto participar en este estudio por voluntad propia.

Nombre del participante en _____ *Firma del participante* _____ *Fecha* _____
mayúsculas

<i>Nombre del representante legal</i>	<i>Firma del representante legal</i>	<i>Fecha</i>
<i>en mayúsculas (si procede)</i>	<i>(si procede)</i>	

Declaración del Investigador/a Principal:

Yo, el abajo firmante, certifico que, a mi saber y entender, el participante que firma este formulario de consentimiento ha recibido una explicación completa y detallada sobre el estudio, una respuesta satisfactoria a todas sus preguntas, y que éste ha entendido perfectamente la naturaleza, riesgos y beneficios de su participación en este estudio de investigación.

<i>Nombre del IP en mayúsculas</i>	<i>Firma del IP</i>	<i>Fecha</i>
------------------------------------	---------------------	--------------

Cargo del IP

Testigo (si procede)

Certifico que la información contenida en el formulario de consentimiento ha sido fielmente explicada al paciente y que aparentemente este la ha comprendido. El paciente acepta libremente participar en el estudio de investigación.

<i>Nombre del testigo en mayúsculas</i>	<i>Firma del testigo</i>	<i>Fecha</i>
---	--------------------------	--------------

11. Bibliografía

1. WHO (World Health Organisation). Global Tuberculosis Report. 2017.
2. Organización Mundial de la Salud. Resumen ejecutivo del Informe mundial sobre la tuberculosis 2017. 2017; Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2017_executive_summary_es.pdf
3. Organización Mundial de la Salud. Asamblea Mundial de la Salud. 65.^a Asamblea Mundial de la Salud. 2012;19–24. Available from: http://www.who.int/nutrition/topics/WHA65.6_resolution_sp.pdf?ua=1
4. Departament de Salut Pública, Catalunya. La tuberculosi a Catalunya l'any 2016 Informe preliminar Sub-direcció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública. 2017; Available from: http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/contingut_responsiu/salutAZ/T/tuberculosis/documents_prof/arxius/informe_preliminar_tuberculosis_2016.pdf
5. Fitzgerald DW, Sterling TR, Haas DW. CAPÍTULO 251. Mycobacterium tuberculosis. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. Mandell, Douglas y Bennett Enfermedades infecciosas Principios y práctica. 2016. p. 2852–86.
6. González-Martín J, García-García JM, Anibarro L, Vidal R, Esteban J, Blanquer R, et al. Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. Arch Bronconeumol. 2010;46(5):255–74.
7. MacLean E, Pai M. Urine Lipoarabinomannan for Tuberculosis Diagnosis: Evolution and Prospects. Clin Chem [Internet]. 2018;000:clinchem.2018.286625. Available from: <http://www.clinchem.org/lookup/doi/10.1373/clinchem.2018.286625>
8. Innovations B. Biotech innovations. 2017;318(6):2017.
9. Paris L, Magni R, Zaidi F, Araujo R, Saini N, Harpole M, et al. Urine

- lipoarabinomannan glycan in HIV-negative patients with pulmonary tuberculosis correlates with disease severity. 2017;1–12.
10. Young BL, Mlamla Z, Gqamana PP, Smit S, Roberts T, Peter J, et al. The identification of tuberculosis biomarkers in human urine samples. *Eur Respir J*. 2014;43(6):1719–29.
 11. Hoffmann E, Machelart A, Song OR, Brodin P. Proteomics of Mycobacterium infection: Moving towards a better understanding of pathogen-driven immunomodulation. *Front Immunol*. 2018;9(JAN):1–8.
 12. Gullón JA, García-García JM, Villanueva MÁ, Álvarez-Navascues F, Rodrigo T, Casals M, et al. Costes de la tuberculosis en España: factores relacionados. *Arch Bronconeumol* [Internet]. 2016;52(12):583–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300289616301235>
 13. López-Torres Hidalgo J. “Pagar por publicar” en revistas científicas. *Rev Clínica Med Fam* [Internet]. 2015;8(3):179–81. Available from: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-695X2015000300001&lng=es&nrm=iso&tlng=e