

Pedro García-Martos,  
Lidia García-Agudo,  
María José Rodríguez-  
Jiménez,  
Manuel Rodríguez-Iglesias.

# Identificación rápida en cultivos líquidos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante un método inmunocromatográfico

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz.

## RESUMEN

**Introducción:** Recientemente, se ha desarrollado un sencillo y rápido método comercial (BD MGIT TBc ID) que emplea un anticuerpo monoclonal anti-MPT64 para la diferenciación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* de otras micobacterias por inmunocromatografía.

**Métodos:** Evaluamos en este trabajo la utilidad clínica del método para la identificación de 51 cepas del complejo *M. tuberculosis* y 24 cepas de otras micobacterias pertenecientes a 14 especies diferentes, comparándolo con el método de hibridación con sondas de ADN.

**Resultados:** El resultado del método inmunocromatográfico fue excelente, con una sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo de 98, 100, 96,1 y 98,7%, respectivamente.

**Conclusiones:** Estos resultados indican que el método inmunocromatográfico puede ser usado con seguridad para la identificación rápida del complejo *M. tuberculosis* en combinación con el cultivo en medios líquidos. El método es extremadamente sencillo, ofrece resultados en sólo 15 minutos, no requiere equipamiento complejo ni personal especializado y puede ser una buena alternativa a los métodos moleculares, especialmente en pequeños laboratorios.

**Palabras clave:** *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, micobacterias, tuberculosis, inmunocromatografía,

## Rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex from broth cultures by immunochromatographic assay

### SUMMARY

**Background:** Recently, a simple and rapid commercial assay (BD MGIT TBc ID) has been developed using a monoclonal antibody anti-MPT64 for the differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex from other mycobacteria by immunochromatography.

**Methods:** We evaluate in this work the clinical usefulness of the test for the identification of 51 strains of *M. tuberculosis* complex and 24 strains of other mycobacteria belonging to 14 different species, compared with the method of hybridization with DNA probes.

**Results:** Immunochromatographic method performance was excellent, with sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of 98, 100, 96.1, and 98.7%, respectively.

**Conclusions:** These results indicate that immunochromatographic assay can be safely used for rapid identification of *M. tuberculosis* complex in combination with culture in liquid media. The test is extremely simple, provides results in just 15 minutes, requires no complex equipment or specialized personnel and may be a good alternative to molecular methods, especially in small laboratories.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, mycobacteria, tuberculosis, immunochromatography

## INTRODUCCIÓN

La utilización de medios de cultivo líquidos para el diagnóstico de tuberculosis ha reducido el tiempo de detección de *Mycobacterium tuberculosis*<sup>1</sup>. Sin embargo, desde el punto de vista clínico, es muy importante la diferenciación del complejo *M. tuberculosis* de otras micobacterias con el fin de aplicar cuanto antes un tratamiento adecuado y prevenir la diseminación de la enfermedad<sup>2</sup>. La identificación de micobacterias es compleja, pero la aparición de los métodos de

Correspondencia:  
Dr. Pedro García-Martos  
Av. Ana de Viya 13, 2-B. 11009 Cádiz  
Tfno: 956-003068  
Fax: 956003081  
E-mail: pedromartos@hotmail.com

biología molecular ha posibilitado ampliamente la caracterización de especies y el reconocimiento de nuevos taxones micobacterianos<sup>3,4</sup>. El inconveniente que presentan muchos de estos métodos es su complejidad, aparte del precio elevado y la dificultad para introducirlos en modestos laboratorios. Actualmente, la hibridación con sondas de ácidos nucleicos constituye uno de los métodos más empleado en la identificación de las especies de interés clínico, pero se hace necesario disponer de un método rápido y sencillo.

En los últimos años ha aparecido en el mercado un método inmunocromatográfico que detecta el antígeno MPT64, también denominado MPB64, una fracción proteica micobacteriana de 24 kDa segregada específicamente por el complejo *M. tuberculosis* durante el crecimiento en el cultivo<sup>5,6</sup> y que constituye un excelente marcador para su identificación<sup>7-11</sup>. Este antígeno se une a una tira de nitrocelulosa a anticuerpos monoclonales específicos, conjugados con partículas de oro coloidal marcadas, producidos por hibridomas obtenidos de la fusión de células de mieloma P3U1 con células esplénicas de ratón inmunizado con MPT64.

El objetivo de nuestro estudio ha sido evaluar la utilidad del método comercial BD MGIT Tbc ID, un inmunoanálisis cromatográfico rápido para la detección cualitativa del complejo *M. tuberculosis* en cultivos líquidos, en comparación con el método de hibridación con sondas de ADN.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Estudiamos 75 cepas de micobacterias cultivadas en el medio BBL MGIT™ Mycobacterial Growth Indicator Tube® (Becton Dickinson, USA), entre las que se incluyeron 15 especies diferentes: 50 del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, 1 *M. bovis* BCG, 4 *M. avium*, 2 *M. intracellulare*, 2 *M. kansasii*, 1 *M. marinum*, 3 *M. fortuitum*, 3 *M. chelonae*, 2 *M. abscessus*, 1 *M. alvei*, 1 *M. brumae*, 1 *M. smegmatis*, 1 *M. peregrinum*, 1 *M. mageritense*, 1 *M. senegalense* y 1 *M. neoaurum*. La identificación del complejo *M. tuberculosis* se realizó por hibridación con sondas de ADN Accuprobe® (Gen-Probe, bioMérieux, Francia); la identificación del resto de micobacterias se llevó a cabo por métodos moleculares.

Todas las cepas se procesaron mediante el método BD MGIT™ Tbc ID® (Becton Dickinson, USA) antes de 72 horas de la positividad del cultivo, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Un volumen de 100 µl del cultivo fue depositado en el pocillo de muestra de la tira de análisis correspondiente y, transcurridos 15 minutos, se registró el resultado. La observación de dos bandas de precipitación de color rosa-rojo, una en la posición "C" (control) y otra en la posición "T" (análisis), fue considerada indicativa de la presencia de antígeno MPT64 en la muestra; la ausencia de banda en la posición "T" fue interpretada como un resultado negativo; la ausencia de banda en la posición "C" invalidó el resultado.

Con los datos obtenidos, calculamos la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del método inmunocromatográfico para la

identificación del complejo *M. tuberculosis* con respecto al método de hibridación con sondas de ADN.

Por otra parte, evaluamos el rendimiento del método inmunocromatográfico en las cepas del complejo *M. tuberculosis* cultivadas en medio sólido de Löwenstein-Jensen. Para ello tomamos 1-3 colonias del cultivo y las depositamos en un tubo con 8-10 perlas de vidrio, las disgregamos en un rotador-mezclador (Vórtex) hasta observar turbidez homogénea en las paredes del tubo y resuspendimos en 1 ml de tampón fosfato pH 7,4 con 0,1% de Tween 80, procediendo posteriormente a la realización del método inmunocromatográfico de la misma forma que para el medio líquido. Empleamos también como diluyente 1 ml de medio Middlebrook 7H9 en 10 de estas cepas y, en otras 10, 1 ml de solución salina.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la evaluación del método inmunocromatográfico BD MGIT Tbc ID sobre las 75 cepas estudiadas se muestran en la tabla 1. Un total de 50 cepas pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* dieron positiva la prueba, pero la cepa de *M. bovis* BCG dio resultado negativo. El resto de las cepas de micobacterias fueron negativas. La coloración de las bandas de reacción fue perceptible, generalmente, antes de los 10 minutos, pero la intensidad máxima del color apareció a los 15 minutos. Siete cepas con una lectura entre 50.000-90.000 RUL en el método de

| Tabla 1                  |                 | Resultados de diferentes especies de micobacterias analizadas mediante el método BD MGIT Tbc ID. |           |
|--------------------------|-----------------|--|-----------|
| Especies                 | Número de cepas | Positivas  | Negativas |
| <i>M. tuberculosis</i>   | 50              | 50   | 0         |
| <i>M. bovis</i> BCG      | 1               | 0  | 1         |
| <i>M. avium</i>          | 4               | 0  | 4         |
| <i>M. intracellulare</i> | 2               | 0  | 2         |
| <i>M. kansasii</i>       | 2               | 0  | 2         |
| <i>M. marinum</i>        | 1               | 0  | 1         |
| <i>M. fortuitum</i>      | 3               | 0  | 3         |
| <i>M. chelonae</i>       | 3               | 0  | 3         |
| <i>M. abscessus</i>      | 2               | 0  | 2         |
| <i>M. alvei</i>          | 1               | 0  | 1         |
| <i>M. brumae</i>         | 1               | 0  | 1         |
| <i>M. smegmatis</i>      | 1               | 0  | 1         |
| <i>M. peregrinum</i>     | 1               | 0  | 1         |
| <i>M. mageritense</i>    | 1               | 0  | 1         |
| <i>M. senegalense</i>    | 1               | 0  | 1         |
| <i>M. neoaurum</i>       | 1               | 0  | 1         |

hibridación mostraron una coloración débil de la banda de análisis.

Teniendo en cuenta nuestros resultados, el método inmunocromatográfico ofreció una sensibilidad del 98% y una especificidad del 100%; el valor predictivo positivo fue 100%, el valor predictivo negativo 96,1% y la eficiencia 98,7%.

Los resultados para las cepas del complejo *M. tuberculosis* cultivadas en medio sólido fueron idénticos a los obtenidos en medio líquido, tanto empleando tampón fosfato de diluyente como medio Middlebrook 7H9 y solución salina.

## DISCUSIÓN

El aumento de casos de tuberculosis en todo el mundo aconseja la rápida confirmación del laboratorio de infección activa. Dada la falta de sensibilidad de la microscopía, el cultivo es necesario en muchos casos para establecer el diagnóstico. Los cultivos líquidos se han mostrado rápidos y rentables para este propósito desde hace más de una década<sup>5</sup>.

El método inmunocromatográfico BD MGIT TBc ID evaluado por nosotros ha demostrado gran utilidad para la diferenciación del complejo *M. tuberculosis* de otras micobacterias. La sensibilidad del procedimiento con respecto a la hibridación con sondas de ADN ha sido alta (98%) y la especificidad del 100%. Según estudios similares la sensibilidad oscila entre el 95,4-100% y la especificidad es del 100%<sup>9-11</sup>. En nuestra serie, si eliminamos la única cepa de *M. bovis* BCG ensayada, aislada de un paciente marroquí que había recibido inmunoterapia, la sensibilidad del método alcanzaría el 100%.

Es sabido que el antígeno MPT64 es altamente específico para el complejo *M. tuberculosis*, incluyendo a *M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. bovis*, pero algunas cepas de *M. bovis* BCG no producen este antígeno y, por tanto, ofrecen un resultado de análisis negativo cuando se analizan con este método<sup>2,5,7,12,13</sup>. Como el hallazgo de *M. bovis* BCG es ocasional en nuestro país, podemos afirmar que la sensibilidad del método es excelente y resulta una segura elección para el diagnóstico de tuberculosis en cualquier laboratorio de Microbiología, reservando la hibridación con sondas de ADN, más lenta y costosa, para casos aislados. No obstante, los resultados deben valorarse junto con la información disponible de la situación clínica del paciente y otros procedimientos diagnósticos, pues un resultado negativo no siempre descarta la posibilidad de infección.

Las limitaciones del método radican en la posibilidad de obtener resultados falsos positivos y negativos, aunque esto sucede raramente. Se ha descrito positividad en infecciones mixtas por *M. tuberculosis* y *M. avium*<sup>2</sup>, y resultados positivos ocasionales en cepas de *M. kansasii*, *M. marinum* y *M. flavescens*<sup>7,11</sup>, siempre con una reacción muy débil en la banda de análisis. Los resultados falsos negativos ocurren en cepas de *M. bovis* y *M. bovis* BCG que no producen el antígeno y en cepas con mutaciones del gen *mpt64* excepcionales<sup>2,14</sup>. También se ha observado negatividad en cepas analizadas inmediatamente después de la detección de crecimiento en el cultivo, que tras reincubación de 24 horas más fueron

positivas<sup>10</sup>. Hay que considerar también la subjetividad de la lectura de la banda de reacción, que a veces se colorea débilmente si existe un bajo nivel de expresión del antígeno. No hay, sin embargo, ningún problema de pérdida de reactividad del antígeno una vez secretado en el medio, ya que se ha comprobado que es estable durante muchos meses<sup>2</sup>.

Podemos concluir que el método inmunocromatográfico BD MGIT TBc ID ensayado identifica bien el complejo *M. tuberculosis*, presenta una excelente sensibilidad y especificidad, un elevado índice de concordancia con el método de hibridación, es rápido en ofrecer resultados, sencillo de ejecución, no necesita equipamiento complejo ni personal altamente especializado y supone, por su menor precio, una buena alternativa a las técnicas moleculares.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Lee JJ, Suo J, Lin CB. Comparative evaluation of the BACTEC MGIT 960 system with solid medium for isolation of mycobacteria. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7:569-74.
2. Hasegawa N, Miura T, Ishii K, Yamaguchi K, Lindner TH, Merritt S, et al. New simple and rapid test for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex: a multicenter study. *J Clin Microbiol* 2002; 40:908-12.
3. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16:319-54.
4. Yam WC, Yuen KY, Kam SY, Yiu LS, Chan KS, Leung CC, et al. Diagnostic application of genotypic identification of mycobacteria. *J Med Microbiol* 2006; 55:529-36.
5. Nagai S, Wiker HG, Harboe M, Kinomoto M. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1991; 59:372-82.
6. Andersen P, Askgaard D, Ljungqvist L, Bennedsen J, Heron I. Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. *Infect Immun* 1991; 59:1905-10.
7. Abe C, Hirano K, Tomiyama T. Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3693-7.
8. Wang JY, Lee LN, Lai HC, Hsu HL, Jan IS, Yu CJ, et al. Performance assessment of the Capilia TB assay and the BD ProbeTec ET system for rapid culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59:395-9.
9. Park MY, Kim YJ, Hwang SH, Kim HH, Lee EY, Jeong SH, et al. Evaluation of an immunochromatographic assay kit for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2009; 47:481-4.
10. Ismail NA, Baba K, Pombo D, Hoosen AA. Use of an immunochromatographic kit for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* from broth cultures. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13:1045-7.
11. Lee JC, Yu FL, Lin MH, Huang GS, Chang CY, Cheng CL, et al. Utility of immunochromatographic assay for detecting *Mycobacterium tuberculosis* from positive BACTEC MGIT 960 cultures. *J Biomed Lab Sci* 2010; 22:64-8.

12. Pfyffer GE, Welscher HM, Kissling P, Cieslak C, Casal MJ, Gutierrez J, et al. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. *J Clin Microbiol* 1997; 35:364-8.
13. Li H, Ulstrup JC, Jonassen JO, Melby K, Nagai S, Harboe M. Evidence for absence of the MPB64 gene in some substrains of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 1993; 61:1730-4.
14. Hirano K, Aono A, Takahashi M, Abe C. Mutations including IS6110 insertion in the gene encoding the MPB64 protein of Capilia Tb negative *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* 2004; 42:390-2.