

10. Goobie S.M., Soriano S.G., Zurakowski D., McGowan F.X., Rockoff M.A. Hemostatic changes in pediatric neurosurgical patients as evaluated by thrombelastograph. *Anesth. Analg.* 2001; 93 (4): 887–92.
11. Bulanov A.Yu., Gorodetskiy V.M., Shcherbakova O.V., Ryazanova I.B., Sudeykina N.N., Shulutko E.M. et al. Thromboelastographic evaluation of the hemostatic system and the effectiveness of its correction before surgery in patients with diseases of the blood system. *Gematologiya i transfuziologiya.* 2012; 57 (5): 36–42. (in Russian)
12. Miller B.E., Bailey J.M., Mancuso T.J., Weinstein M.S., Holbrook G.W., Silvey E.M. et al. Functional maturity of the coagulation system in children: an evaluation using thrombelastography. *Anesth. Analg.* 1997; 84 (4): 745–8.
13. Pivalizza E.G., Pivalizza P.J., Gottschalk L.I., Kee S., Szmuk P., Abramson D.C. Celite-activated thrombelastography in children. *J. Clin. Anesth.* 2001; 13 (1): 20–3.
14. Chan K.L., Summerhayes R.G., Ignjatovic V., Horton S.B., Monagle P.T. Reference values for kaolin-activated thromboelastography in healthy children. *Anesth. Analg.* 2007; 105 (6): 1610–3.
15. Edwards R.M., Naik-Mathuria B.J., Gay A.N., Olutoye O.O., Teruya J. Parameters of thromboelastography in healthy newborns. *Am. J. Clin. Pathol.* 2008; 130 (1): 99–102.
16. Korneev A.A., Krichevets A.N. The conditions of applicability criteria for the Student and Mann-Whitney. *Psikhologicheskiy zhurnal.* 2011; 32 (1): 97–110. (in Russian)
17. Dobrovol'skiy A.B., Titaeva E.V. Coagulation risk factors for thrombosis and laboratory control of anticoagulant therapy. *Aterotromboz.* 2009; 1 (2): 2–14. (in Russian)

Received 30.05.15

## ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.24-002.5-078.33

Цибулькин А.П.<sup>1</sup>, Хаертынова И.М.<sup>1</sup>, Уразов Н.Г.<sup>2</sup>, Хаертынов К.С.<sup>1</sup>

### СКРИНИНГ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА НАТИВНЫХ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ МЫСОБАКТЕРИУМ TUBERCULOSIS МЕТОДОМ ИММУНОБЛОТТИНГА

<sup>1</sup>ГБОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия» Минздрава России, 420012, Казань, Российская Федерация; <sup>2</sup>Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями Минздрава Республики Татарстан, 420097, г. Казань, Российская Федерация

*Методом иммуноблоттинга исследованы поверхностные белки, полученные из клеток M. Tuberculosis, подвергнутых частичной делипидизации. При этом использовались сыворотки больных туберкулезом легких; носителей ВИЧ и пациентов с сочетанной инфекцией ТБ-ВИЧ, а также ВИЧ-отрицательных, без клинических признаков заболевания легких и с хроническими заболеваниями легких другой этиологии. Диагностически значимой оказались фракции низкомолекулярных антигенов молекулярной массой 6,5–30 кДа. С этой фракцией антигенов прореагировали сыворотки всех больных туберкулезом легких и сыворотки 91% пациентов с сочетанной инфекцией ТБ-ВИЧ. Антигены белковых фракций с высокой (70–100 кДа) и промежуточной (30–69 кДа) молекулярной массой оказались диагностически незначимыми.*

**Ключевые слова:** туберкулез; ВИЧ; антигены *M. tuberculosis*; иммуноблоттинг.

**Для цитирования:** Цибулькин А.П., Хаертынова И.М., Уразов Н.Г., Хаертынов К.С. Скрининг диагностического потенциала нативных белковых фракций *Mycobacterium tuberculosis* методом иммуноблоттинга. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 61 (2): 90–92, 102.

DOI 10.18821/0869-2084-2016-61-2-90-92, 102.

*Tsibulkin A.P.<sup>1</sup>, Khaertynova I.M.<sup>1</sup>, Urazov N.G.<sup>2</sup>, Khaertynov K.S.<sup>1</sup>*

#### THE SCREENING OF DIAGNOSTIC POTENTIAL OF NATIVE PROTEIN FRACTIONS OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS USING TECHNIQUE OF IMMUNE BLOTTING

<sup>1</sup>The Kazanskaia state medical academy of Minzdrav of Russia, 420012 Kazan, Russia; <sup>2</sup>The Republican center of prevention and fight of AIDS and infectious diseases of Minzdrav of the Republic of Tatarstan, 420012 Kazan, Russia

*The technique of immune blotting was used to analyze surface proteins obtained from cells M. Tuberculosis exposed to partial mode of delipidization. At that, there were applied serums of patients with tuberculosis of lungs; HIV agents and patients with concomitant infection tuberculosis-AIDS and also HIV-negative patients without clinical signs of disease of lungs and with chronic diseases of lungs of other etiology. The fractions of low-molecular antigens with molecular mass 6.5-30 kilodaltons became diagnostically significant. To this fraction of antigens reacted serums of all patients with tuberculosis of lungs and serums of 91% of patients with concomitant tuberculosis-AIDS infection. The antigens of protein fractions with high (70-100 kilodaltons) and interim (30-69 kilodaltons) molecular mass became diagnostically significant.*

**Key words:** tuberculosis; AIDS; antigens *M. Tuberculosis*; immune blotting

**For citation:** *Tsibulkin A.P., Khaertina I.M., Urazov N.G., Khaertinov K.S. The screening of diagnostic potential of native protein fractions of Mycobacterium tuberculosis using technique of immune blotting. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2016; 61 (2): 90-92, 102. (in Russ.)*

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-2-90-92, 102.

For correspondence: *Tsibulkin A.P.*, doctor of medical sciences, head of chair of clinical laboratory diagnostic. E-mail: kldkgma@mail.ru

**Conflict of interests.** *The authors declare absence of conflict of interests.*

**Financing.** *The study had no sponsor support.*

Received 19.10.15

Accepted 15.12.15

Туберкулез (ТБ) продолжает оставаться одним из наиболее часто встречаемых инфекционных заболеваний особенно в развивающихся странах. В настоящее время в мире около трети населения являются носителями *M. tuberculosis*. В большинстве случаев у иммунокомпетентного населения инфицирование протекает бессимптомно и характеризуется латентным течением инфекции. Только у 5% инфицированных в течение двух лет после контакта с *M. tuberculosis* развиваются активные формы ТБ. Ежегодно регистрируется 9,4 млн новых случаев заболевания и 1,7 млн смертей от ТБ [1].

Технологическое совершенство и простота выполнения исследований наряду с невысокой себестоимостью делают серологические методы, в частности ИФА, привлекательными для проведения массовой ранней диагностики ТБ [2, 3]. До настоящего времени, несмотря на многочисленные исследования по подбору как нативных, так и рекомбинантных антигенов и антигенных комплексов, не удалось создать ИФА-тест-системы, отвечающей современным требованиям по чувствительности и специфичности [4, 5]. Основной недостаток тест-систем – их невысокая чувствительность. Противотуберкулезные антитела (ПТАТ) выявляются у больных туберкулезом в среднем в 71,5% случаев [6].

Широкому внедрению серодиагностики ТБ препятствуют такие факторы, как гетерогенность иммунного ответа на антигены *M. tuberculosis* у отдельных пациентов; своеобразие синтеза противотуберкулезных антител у больных, отличающихся по HLA-типу, виду возбудителя, форме и стадии заболевания, бактериальной нагрузке, исходным состоянием здоровья и предшествующей вакцинацией BCG [7–10].

В настоящее время антигены, предназначенные для выявления ПТАТ, различаются как по молекулярной массе, так и по химической природе и являются белками, липо- и гликопротеидами [11,12].

Цель исследования – выявление поверхностных антигенов микобактерии туберкулеза, к которым образуются антитела, если не у всех больных легочной формой, то хотя бы у подавляющего большинства из них.

**Материал и методы.** Для получения антигенного препарата использовали штамм *M. tuberculosis* H37RV, полученный из ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Для этого культуру, выращенную на плотной питательной среде Левенштейна–Йенсена, трижды промывали забуференным физиологическим раствором и подвергали процедуре щадящей делипидизации с последующей солиоблизацией поверхностных компонентов клеточной стенки возбудителя [13].

Полученный антигенный препарат фракционировали методом дискэлектрофореза в пластинчатом 12,5% полиакриламидном геле (ПААГ). Для детекции белковых фракций вырезали небольшой фрагмент геля, в котором проводили окрашивание локализованного материала красителем ку-масси G-250. Электроперенос фракционированных в ПААГ антигенов на нитроцеллюлозную мембрану проводили, используя метод полусухого переноса [14]. Затем высушенную нитроцеллюлозную мембрану нарезали на полоски шириной

в 2–3 мм. Полученные стрипы использовали в реакции иммуноблоттинга со специально отобранными для этих исследований сыворотками.

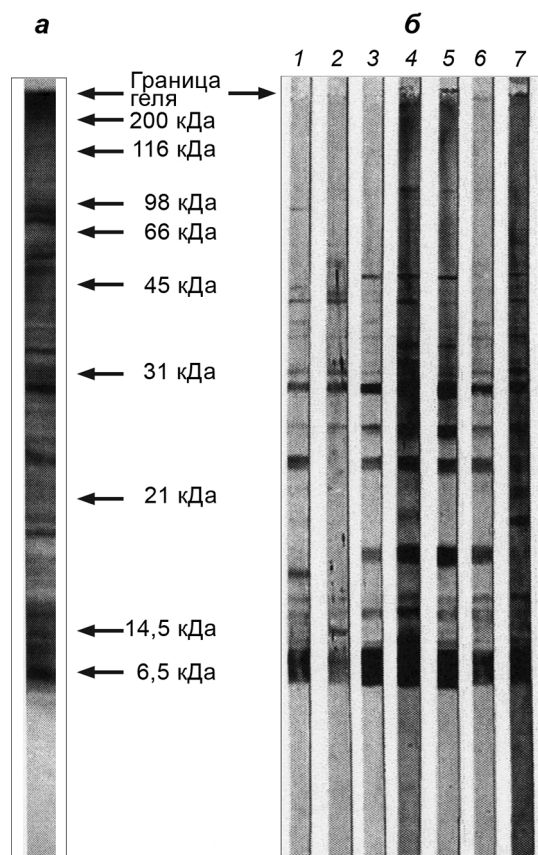
Диагностические возможности серологических тестов при выявлении ТБ значительно различаются в группах ВИЧ-неинфицированных и инфицированных пациентов за счет общеизвестного факта увеличения частоты реактивации латентного ТБ у последних [12]. Тесты, хорошо себя зарекомендовавшие у ВИЧ-отрицательных лиц, начинают давать сбои как по чувствительности, так и по специфичности у ВИЧ-положительных групп населения. При планировании исследования все пациенты были разделены на две группы: первая включала как больных с моноинфекцией ТБ ( $n = 34$ ), так и с сочетанной ТБ-ВИЧ-инфекцией ( $n = 45$ ). Вторая группа – контрольная, сформирована из пациентов с моноинфекцией ВИЧ ( $n = 92$ ) и ВИЧ-отрицательных ( $n = 63$ ), без клинических признаков заболевания легких ( $n = 33$ ) или хронических заболеваний легких ( $n = 30$ ). В последнюю группу включены больные бронхиальной астмой, хронической обструктивной болезнью легких, хронической бактериальной пневмонией (по 10 человек в каждой подгруппе). Формирование контрольной подгруппы, включающей больных с хронической легочной патологией нетуберкулезной этиологии, связано с тем, что именно у таких больных, а не у абсолютно здоровых возникают трудности с клинической диагностикой туберкулеза легких.

Диагнозы: ТБ, ВИЧ-инфекция, бронхиальная астма и другие, устанавливали на основании общепринятых клинико-рентгенологических, эпидемиологических и лабораторных анализов.

Имуноблоттинг проводили с сыворотками в разведениях 1:100 и 1:200 согласно методике [14]. Появление окрашенных зон любой интенсивности рассматривалось как положительный результат. Результаты реакции оценивали визуально.

Диагностическая значимость исследуемых антигенных фракций *M. tuberculosis* оценивалась на основании расчета стандартных показателей: точности (Т), чувствительности (Ч) и специфичности (С) метода, предсказания положительного (ППР) и отрицательного (ПОР) результатов, а также по отношению правдоподобия положительных (ОППР) и отрицательных (ОПОР) результатов. Исследования выполнены в лабораториях Казанской государственной медицинской академии Минздрава РФ и Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями Минздрава Республики Татарстан.

**Результаты и обсуждение.** Белковый спектр антигенного препарата, использованного при проведении иммуноблоттинга для исследования отобранных сывороток, представлен на рисунке, а. Он содержит около 20 фракций мол. массой от 6,5 до 100 кДа. На рисунке, б приведены несколько образцов иммуноблотов, полученных с сыворотками больных легочной формой ТБ. Аналогичные иммуноблоты, полученные с использованием в общей сложности 234 сывороток, включая и приведенные на рисунке, б, – это материал для последующего анализа.



Белковый спектр антигенного препарата и серологическая активность фракций.

*a* – электрофоретический профиль препарата, фракционированного в 12,5% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия; *б* – серопозитивные фракции, полученные в реакции иммуноблоттинга с семью индивидуальными сыворотками больных туберкулезом легких.

Одна из задач исследования заключалась в определении группы поверхностных белков *M. tuberculosis*, с которой бы реагировали если не все, то хотя бы большинство сывороток больных ТБ легких.

Для этого выделенные белковые фракции были разделены по мол. массе: 6,5–29, 30–49, 50–59, 60–69, 70–79, 80–100 кДа. При этом учитывалось использование в дальнейшем приема дробной фильтрации для выделения нужной фракции антигенов.

Обнаружение на иммуноблоте хотя бы одной серопозитивной фракции расценивалось как свидетельство наличия в сыворотке специфических антител к определенному антигену в исследуемом препарате (положительный ответ). В случае присутствия на иммуноблоте нескольких различающихся по молекулярной массе серопозитивных фракций сыворотка отмечалась как положительная в нескольких соответствующих молекулярной массе антигенов группах. Для наглядности количество сывороток, позитивно прореагировавших с антигенами, выражали в процентах (см. таблицу).

Сыворотки больных ТБ легких без сопутствующей ВИЧ-инфекции содержат антитела ко всему спектру поверхностных антигенов *M. tuberculosis*. Чувствительность реакции, проявляемая в разных группах антигенов, существенно различается. Наибольшая чувствительность 100% в реакции иммуноблоттинга проявляется во фракции антигенов мол. массой 6,5–29 кДа: с ними прореагировали все без исключения сыворотки

#### Диагностические возможности антигенных фракций *M. tuberculosis*

Показатель	ВИЧ-отрицательные пациенты					
	молекулярная масса, кДа					
	6,5–29	30–49	50–59	60–69	70–79	80–100
ТБ ( <i>n</i> = 34; 100%)	100	41	27	53	15	9
К ( <i>n</i> = 63; 100%)	3	60	62	44	0	0
Т, %	98	40	34	55	11	68
Ч, %	100	41	27	53	15	9
С, %	91	40	38	56	100	100
ППР, %	94	27	19	39	100	100
ПОР, %	100	56	49	69	68	67
ОППР	33	0,68	0,43	1,20	15	9
ОПОР	0,01	1,47	1,92	0,84	0,85	0,91
Показатель	ВИЧ-положительные пациенты					
	молекулярная масса, кДа					
	6,5–29	30–49	50–59	60–69	70–79	80–100
ТБ/ВИЧ ( <i>n</i> = 45; 100%)	91	42	42	42	18	18
ВИЧ ( <i>n</i> = 92; 100%)	27	22	19	24	11	0
Т, %	79	66	66	65	66	73
Ч, %	91	42	42	42	18	18
С, %	73	78	81	76	80	100
ППР, %	63	49	53	46	56	100
ПОР, %	94	73	74	73	70	71
ОППР	3,37	1,91	2,21	1,75	0,9	18
ОПОР	0,12	0,74	0,72	0,76	1,02	0,82

Примечание. ТБ – сыворотки пациентов с ТБ-моноинфекцией; К – сыворотки контрольной группы; ТБ/ВИЧ – сыворотки пациентов с сочетанной ТБ/ВИЧ-инфекцией; ВИЧ – сыворотки пациентов с ВИЧ-моноинфекцией.

больных ТБ легких. С указанной группой антигенов проявляется и наиболее высокая специфичность реакции, поскольку с этими антигенами положительно прореагировали только 3% сывороток пациентов из контрольной группы. Именно поэтому получены достаточно высокие показатели ППР – 94%, ОППР – 33 и очень низкий ОПОР – 0,01.

В остальных 5 фракциях с мол. массами 30–49, 50–59, 60–69, 70–79, 80–100 кДа чувствительность реакции была значительно ниже и колебалась от 53% (60–69 кДа) до 9% (80–100 кДа). В диапазоне молекул. масс 30–100 кДа и специфичность реакции достаточно низкая. Среди антигенов с мол. массой 30–49, 50–59, 60–69 кДа положительно реагировали 60, 62 и 44% контрольных сывороток соответственно. Такие показатели, как ОППР, ОПОР, ПОР уступают аналогичным, проявляемым с антигенами с мол. массой 6,5–29 кДа. Исключением является ППР (100%) для антигенов с мол. массой 70–100 кДа, но диагностической ценности они не представляют из-за очень низкой чувствительности реакции.

Что касается реакции антигенов 6,5–30 кДа с сыворотками пациентов с ТБ/ВИЧ-инфекцией и ВИЧ-моноинфекцией (см. таблицу), то наблюдается более низкий показатель чувствительности – 91% и специфичности – 73%. Этот результат согласуется с ранее полученными данными о диагностической ценности серологических тестов при выявлении ТБ, которая

См. продолжение на с. 102

значительно различается в группах ВИЧ-неинфицированных и ВИЧ-инфицированных пациентов [12].

Во фракциях 30–49, 50–59, 60–69 кДа чувствительность реакции с сыворотками носителей сочетанной ТБ/ВИЧ-инфекций была низкой и равнялась 42%, а в 70–79, 80–100 кДа она составляла 18%. Во фракциях 30–49, 50–59, 60–69, 70–79 кДа с антигенами прореагировало от 11 до 24% сывороток пациентов с ВИЧ-инфекцией, тогда как с антигенами 80–100 кДа – ни одной. Значения ОППР, ОПОР, ППР, ПОР, чувствительности и специфичности уступают показателям, которые наблюдаются в реакциях исследуемых антигенов с сыворотками ВИЧ-неинфицированных пациентов.

Возможно, низкая диагностическая значимость поверхностных антигенов с мол. массой 30–100 кДа *M. tuberculosis* связана с высокой частотой положительных ответов в реакциях с контрольными сыворотками, которые обусловлены сходными с *M. tuberculosis* антигенами других видов микробов [2, 15]. Не исключено, что некоторые из этих антигенов являются стресс-белками, которые широко распространены среди бактерий [16].

Наибольшую диагностическую ценность как для проведения скрининга на ТБ, так и для исследования сывороток ВИЧ-инфицированных пациентов представляет группа поверхностных антигенов *M. tuberculosis* с мол. массой 6,5–29 кДа. В дальнейших исследованиях для повышения специфичности реакции необходимо выяснить, какие именно антигены реагируют с сыворотками ВИЧ-инфицированных пациентов, чтобы подобрать условия для удаления их из антигенного препарата.

#### Выводы.

1. Щадящий способ делипидизации *Mycobacterium tuberculosis* позволяет получить антигенный препарат, при фракционировании в 12,5% ПААГ в денатурирующих условиях разделяется на 20 белковых фракций.

2. Наибольшую активность в реакции иммуноблоттинга с сыворотками больных туберкулезом легких проявляет группа антигенов с мол. массой 6,5–29 кДа при высокой диагностической значимости метода (ППР 94%; ПОР 100%; ОППР 33, ОПОР 0,01).

3. Диагностическая значимость использования данной группы антигенов в реакции иммуноблоттинга с сыворотками ВИЧ-инфицированных пациентов значительно ниже (ППР 63% и ОППР 3,37).

#### Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–3, 5, 7–11, 14–16 см. REFERENCES)

- Карпов А.В. Сравнительная эффективность раннего выявления туберкулеза иммунологическими методами. *Вестник Новгородского государственного университета им. Ярослава Мудрого*. 1998; (7).
- Чуканов В.И., Слогодская Л.В. Особенности диагностики и эффективность лечения больных туберкулезом легких без бактериовыделения. *Проблемы туберкулеза и болезней легких*. 2007; (11): 22–5.
- Цибулькин А.П., Хаертынова И.М., Герасимова С.В., Хаертынов К.С. Диагностическая значимость метода ИФА для определения противотуберкулезных антител в группах ВИЧ-положительных и отрицательных пациентов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; (12): 41–4.
- Хаертынова И.М., Цибулькин А.П., Валиев Р.Ш., Романенко О.М., Филимонова М.Н., Уразов Н.Г. и др. Способ получения антигенного препарата из *Mycobacterium tuberculosis* с расширенным спектром серопозитивных фракций в реакции иммуноблоттинга. Патент РФ № 2431675; 2011.

#### REFERENCES

- Kunnath-Velayudhan S., Davidow A.L., Wang H.Y., Molina D.M., Huynh V.T., Salamon H. et al. Proteome-scale antibody responses and outcome of *Mycobacterium tuberculosis* infection in nonhuman primates and in tuberculosis patients. *J. Infect. Dis.* 2012; 206 (5): 697–705.
- Dayal R., Singh A., Katoch V.M., Joshi B., Chauhan D.S., Singh P. et al. Serological diagnosis of tuberculosis. *Indian J. Pediatr.* 2008; 75 (12): 1219–21.
- Lalvani A., Pareek M. A 100 year update on diagnosis of tuberculosis infection. *Br. Med. Bull.* 2010; 93: 64–84.
- Karpov A.V. Comparative efficiency of early detection of tuberculosis by immunological methods. *Vestnik Novgorodskogo gosudarstvennogo universiteta im. Yaroslava Mudrogo*. 1998; (7). (in Russian)
- Mukherjee S., Daifalla N., Zhang Y., Douglass J., Brooks L., Vedvick T. et al. Potential serological use of a recombinant protein that is a replica of a *Mycobacterium tuberculosis* protein found in the urine of infected mice. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004; 11 (2): 280–6.
- Chukanov V.I., Slogotskaya L.V. The diagnosis and effective treatment of patients with pulmonary tuberculosis-negative. *Problemy tuberkuleza i bolezney legkikh*. 2007; (11): 22–5. (in Russian)
- Demkow U., Filewska M., Michalowska-Mitczuk D., Kus J., Jagodzinski J., Zielonka T. et al. Heterogeneity of antibody response to mycobacterial antigens in different clinical manifestations of pulmonary tuberculosis. *J. Physiol. Pharmacol.* 2007; 58 Suppl. 5 (Pt. 1): 117–27.
- Abebe F., Holm-Hansen C., Wiker H.G., Bjune G. Progress in serodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Scand. J. Immunol.* 2007; 66 (2–3): 176–91.
- Chen J., Su X., Zhang Y., Wang S., Shao L., Wu J. et al. Novel recombinant RD2- and RD11-encoded *Mycobacterium tuberculosis* antigens are potential candidates for diagnosis of tuberculosis infections in BCG-vaccinated individuals. *Microbes Infect.* 2009; 11 (10–11): 876–85.
- Parsons L.M., Somoskövi A., Gutierrez C., Lee E., Paramasivan C.N., Abimiku A. et al. Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities. *Clin. Microbiol. Rev.* 2011; 24 (2): 314–50.
- Walzl G., Ronacher K., Hanekom W., Scriba T.J., Zumla A. Immunological biomarkers of tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* 2011; 11 (5): 343–54.
- Tsibul'kin A.P., Khaertynova I.M., Gerasimova S.V., Khaertynov K.S. The diagnostic importance of the ELISA method for definition of antitubercular antibodies in groups of HIV-positive and negative patients. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; (12): 41–4. (in Russian)
- Khaertynova I.M., Tsibul'kin A.P., Valiev R.Sh., Romanenko O.M., Filimonova M.N., Urazov N.G. et al. A Method of Obtaining an Antigenic Preparation from *Mycobacterium Tuberculosis* with Spread Spectrum Seropositive Fractions in Reaction of Immunoblotting. Patent RF № 2431675; 2011. (in Russian)
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979; 76 (9): 4350–4.
- Olds G.R., Sanson A.J., Daniel T.M. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 epitopes by using a panel of 19 monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25 (3): 471–5.
- Thole J.E., Keulen W.J., De Bruyn J., Kolk A.H., Groothuis D.G., Berwald L.G. et al. Characterization, sequence determination, and immunogenicity of a 64-kilodalton protein of *Mycobacterium bovis* BCG expressed in *Escherichia coli* K-12. *Infect. Immunol.* 1987; 55 (6): 1466–75.