□ 원 저 □

Immunoblotting에 의한 결핵환자 혈청과 반응하는 인형 결핵균 항원의 분석

대한결핵협회 결핵연구원

박 영 길 · 배 길 한 · 김 상 재

서울대학교 의과대학 내과학교실

노 용 호 · 김 건 열 · 한 용 철

= Abstract =

Immunoblotting Analysis on Antigenic Components of Crude Cell Extract (TE) from *Mycobacterium tuberculosis* with Sera from Tuberculosis Patients

Young Kil Park, Gill Han Bai, and Sang Jae Kim, Sc.D.

*Korean Institute of Tuberculosis, Korean National Tuberculosis
Association*

Yong Ho Roh, M.D., Keun Youl Kim, M.D. and Yong Chol Han, M.D.

*Department of Internal Medicine, Tuberculosis Research Institute,
College of Medicine, Seoul National University*

This study was aimed to identify antigenic components of *Mycobacterium tuberculosis* having relative specificity and sensitivity for the serodiagnosis of pulmonary tuberculosis.

Sonicated cell extract (TE) of *M. tuberculosis* was used as an antigen with which sera from tuberculous or non-tuberculous patients and from normal persons were reacted.

Three antigenic components (135KD, 92KD, 28KD) were found to be useful for the diagnosis of patients infected with mycobacterial species because they reacted only with sera from patients with pulmonary tuberculosis.

Two antigenic components (38KD, 24KD) reacted with sera from tuberculosis patients which had been absorbed with sonicated nontuberculous mycobacterial cell extracts. 38KD-protein of them was found to be more useful than 24KD-protein in discrimination of tuberculosis from non-tuberculosis patients because antibodies to the component were detected in sera from 9 of 13 tuberculosis patients while 24KD-protein was reacted with sera from 3 of 13 tuberculosis patients.

Four antigenic components (41KD, 33KD, 29KD, 28KD) weakly reacted or did not react at all with sera from tuberculosis patients that had been collected after completion of successful treatment. Especially 28KD-protein was found to be useful in discrimination treated persons from untreated cases fairly well because it did not react with sera from 7 of 10 patients that had been collected after completion of successful treatment.

서 론

Mycobacteria는 종사이에 공유하는 항원결정군 (shared antigenic determinants)이 많아서 여러가지 면역학적 반응에서 심한교차반응을 나타낸다¹⁾. 그래서 결핵의 면역학적 진단용으로 쓸 수 있는 결핵균 특이항원을 얻으려는 연구는 아직도 여러 날에서 계속되고 있다.

1890년 Robert Koch의 액체배양여액을 농축하여 만든 Old Tuberculin (OT)이 결핵균 항원 생산의 효시가 되었다²⁾. 그러나 Tuberculin피부반응검사는 특이성의 결여로 신뢰도가 문제되었다. Seibert(1941)가 OT의 비특이 반응 문제를 개선하기 위해 표준정제 항원인 PPD-S를 생산하였다³⁾. 그후 alcohol, 산 및 ammonium sulfate등을 이용한 항원 성분의 분리정제법과 gel filtration 또는 ion-exchange chromatography를 이용하여 항원을 분리정제하였다^{2,4,5)}. 또 면역 전기영동법을 이용하여 복합 항원제품내의 항원을 동정하기도 하였다⁶⁾. 최근에는 단일 항원 결정군에 대한 murine monoclonal antibody (MMCA)의 양산이 가능해지고 결핵균 항원에 대한 제조할 유전자를 이용한 고도의 정제항원 및 특이 결정군의 양산도 가능해졌다^{7,8,9)}.

정제항원이나 MMCA도 중요하지만 부리정제된 항원 분자내에 분포하는 항원결정군의 수도 다를뿐 아니라 동물 숙주에 따라서 인지하는 항원결정군도 다를 수 있으므로 생산목적에 적합한 생물학적 성상을 가진 항원을 동정하는 것이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 사람 혈청에 반응 하는 항원성분을 immunoblotting으로 분석하여 보다 특이적인 결핵균 항원성분을 동정하고 어떤 항원이 치료진후에 반응항체 작용이 차이가 큰지를 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주와 배양

인형결핵균(*M. tuberculosis* H₃₇Rv), *M. Kansasi* (KIT 20002), *M. scrofaceum* (KIT 30003), *M. intracellulare* (KIT 41003), *M. fortuitum* (KIT 60002)등을 37°C에서 satou액체배지에서 2-4주간 배양하였다. 균괴는 1%석탄산으로 사멸시킨후 0.067M 인산 완충액으로 세척하여 항원(TE)제조 및 결핵환자 혈청내에 존재

하는 교차 반응 항체를 흡수 제거하는데 사용하였다.

2. 항원 생산

균을 Tris 완충액(50 mM Tris-Cl, 5 % glycerol, pH7.8 1 : 4(w/v))으로 부유시킨후 초음파로 균을 파쇄하였다. 얼음을 순환시켜 최대 60% 출력으로 10분씩 4회 실시하였다. 15,000 g로 30분간 원심분리하여 상층액에 활성탄 0.05%를 첨가한후 얼음위에서 1시간동안 흔들어서 지방을 흡수시켰다¹⁰⁾. 다시 20,000 g로 30분간 원심분리하여 상층액을 0.2 um 여과막에 통과 시킨 액체를 항원으로 사용하였다. 이를 TE라고 명명하였다. Lowry법으로 측정한 단백질량은 1.1 mg/ml이었다¹¹⁾. 이외에도 Chaparas SD로 부터 기증받은 *M. tuberculosis* H₃₇Rv, TMC 107균주의 세포추출물과 배 등¹²⁾이 제조한 Tc, Tb, Ta와 결핵균 배양액을 농축하여 만든 TF를 항원으로 사용하였다.

3. 사람 혈청

객담 도말 양성인 폐결핵 폐결핵 환자 13명의 혈청과 이중 12명의 치료후 혈청 그리고 폐암, 간경화, 천식 및 위암 환자 각 1명과 7명의 건강한의 혈청을 사용하였다.

4. Immunoblotting

Laemmli방법¹³⁾에 의거하여 separation gel은 10%, stacking gel은 4%로 하였고 30 mA로 5시간 항원을 전기영동하였다. Immunoblotting은 Lee등의 방법¹⁴⁾을 적용하였다. 항원을 흡착시킨 nitrocellulose sheet는 Ponceau용액 (0.4% Ponceau 2R, 8% TCA, 2% Acetic acid)로 염색하고 증류수로 항원이 보일정도로 탈색하였다. 표준 단백질 lane과 항원 lane 하나를 잘라 Coomassie 청액에 염색하였다. 남은 항원 lanes는 1% BSA가 함유된 TENT완충액 (50 mM Tris, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.25% gelatin, 0.05 Triton X-100, pH 7.5)에서 2시간 작용시켰다. 다음 TENT용액에 1 : 100으로 희석한 혈청을 5시간 반응시키고 1 : 2,000으로 희석한 사람 IgG에 대한 goat항체와 peroxidase결합체를 2시간 반응시킨후 기질용액(4-Chloro-1-Naphtol)을 반응시켰다.

5. 항산균에 의한 항혈청 흡수

김¹⁵⁾등의 방법에 따라 교차 반응 항체를 흡수 제거시킨

후 환자 혈청을 nitrocellulose sheet의 항원과 반응시켰다. 환자 혈청을 TENT용액에 1 : 200으로 희석한 다음 200 mg/ml의 균파쇄액과 동량으로 섞어 37℃에서 8시간 반응시키고 원심분리후 상층액을 사용하였다.

결 과

1. TE항원에 대한 사람혈청의 반응양상

인형결핵균을 초음파로 파쇄하여 제조한 항원 TE를 immunoblotting으로 분석한 결과 42개 이상의 항원성분이 있음을 알 수 있었다. 이중 결핵환자 혈청과 반응한 항원은 39개였다. 거의 모든 결핵환자 혈청이 항원

2(165KD), 8(110KD), 9(105KD), 11(97KD), 14(84KD), 15(83KD), 17(77KD), 22(60KD), 23(55KD), 24(52KD), 26(48KD)등에 강하게 반응하였다(Fig. 1). 항원 21, 39은 환자 3에서 특히 강하게 반응하였으나 다른 환자 혈청은 약하게 반응하거나 반응이 없었다. 항원 1, 3, 5, 10, 12, 21, 29, 36, 37은 약하게 거의 모든 결핵환자 혈청에 반응하였고 항원 2, 22, 23은 건강인이나 타질환자에게서도 강하게 반응하였다(Table 1). 항원 8, 9, 15, 21, 26은 건강이나 타질환환자에서 약하게 반응하였다. 타질환환자나 건강인에 반응하지 않고 비교적 결핵환자 혈청에만 반응하는 항원은 5(135KD), 12(92KD), 17(77KD), 24(52KD), 37(28KD)등이었다.

Fig. 1. Immunoblotting analysis of *M. tuberculosis* cell extract (TE) separated in a 10% polyacrylamide gel.

SM : size marker stained with Coomassie brilliant blue

TEC : TE stained with Coomassie brilliant blue

P₁—P₅ : reaction patterns of sera of tuberculosis patients to TE

N₁—N₃ : reaction patterns of sera of health persons to TE

Table 1. Reaction Patterns of Sera from Patients and Normal Persons to the Antigenic Components Separated by SDS-PAGE

Ag. No.	MW (KD)	TB patients (13)			Other disease patients (4)		Normal (7)		Ag No.	MW (KD)	TB patients (13)			Other disease patients (4)		Normal (7)	
		S	W	N	W	N	W	N			S	W	N	W	N	W	N
1	190		13			4		7	22	60	12	1		4		6	1
2	165	4	9		4		6	1	23	55	8	5		4		7	
3	148		12	1		4		7	24	52	8	5			4	2	5
4	144		9	4	1	3		7	25	51		7	6		4		7
5	135		12	1		4		7	26	48	4	8	1	3	1	2	5
6	128		7	6		4		7	27	44		2	11		4		7
7	116		6	7		4		7	28	42		4	9	2	2		7
8	110	2	10	1	1	3	1	6	29	41	11	10	2		4		7
9	105	7	6		1	3	2	5	30	36		9	4		4		7
10	102		11	2		4		7	31	36		8	5		4		7
11	97	2	8	3		4	1	6	32	35		3	10		4	1	6
12	92	1	11	1		4		7	33	33		9	4		4		7
13	86		7	6	1	3		7	34	32			13		4		7
14	84	4	8	1	1	3		7	35	30		1	12		4		7
15	83	8	5		2	2	3	4	36	29		12	1		4	2	5
16	81	1	4	8		4		7	37	28		11	2		4		7
17	77	3	9	1		4	1	6	38	26		2	11		4		7
18	70		9	4		4	1	6	39	24	1	2	10		4		7
19	66		6	7		4		7	40	22		1	12		4		7
20	65		7	6		4	1	6	41	13			13		4		7
21	63	1	10	2	1	3	2	5	42	11			13		4		7

* S : strong reaction, W : weak reaction, N : no reaction

2. 항산균에 의한 결핵환자 혈청의 흡수 결과

결핵환자 1, 3, 6의 혈청은 혼합하여 희석해 동종 및 이종 항산균 파쇄액과 반응시켜 각 항원에 해당되는 항체는 흡수 제거시킨후 TE항원과 반응시켰다. 그 결과 항원 15, 21, 22, 23, 30, 39등에 대한 항체는 타 항산균으로 흡수가 덜 되어 선명하게 남았으며 항원 2, 3, 9, 24, 26은 약하게 남았다(Fig. 2). 항원 15, 21, 22, 23은 매우 희미하지만 결핵균 자체 흡수에서 남았었다(Table 2). 항원 30(38KD), 39(24KD)에 대한 항체는 결핵균 흡수에서는 제거되었으나 타항산균 흡수에서는 남아있어 선명한 반응을 보였다.

3. 치료한 결핵환자 혈청 반응 양상

치료한 결핵환자의 경우, 치료전보다 대부분의 항원

이 약간 약하게 반응하였다(Fig. 3). 환자 3의 경우는 치료후 전체가 뚜렷이 감소하였다. 환자 7의 경우는 치료전이나 후에도 TE항원에게 거의 반응하지 않았다. 항원 29(41KD), 33(33KD), 36(29KD), 37(28KD)은 치료후 뚜렷이 약하게 반응하였다(Table 3).

4. TE와 다른 항원의 비교

TE항원과 Chaparas SD로 부터 기증받은 *M. tuberculosis* H₃₇Rv와는 거의 일치하였으며 *M. tuberculosis* TMC 107은 전체적으로 강하게 나타났다(Fig. 4). 배등¹²⁾이 제조한 항원 Tc는 항원 15, 24, 37, 39등이 강한 반응을 보였다. Tb는 항원 15, 24, 36이 비교적 뚜렷하였으며 Ta는 항원 36에서 반응하였다. 배양여액을 농축하여 만든 TF에서도 항원 15, 23, 36, 37, 39에 해당되는 부분에서 강한 반응을 나타냈었다. 항원 27(28KD)

Table 2. Reaction Patterns of Tuberculosis Sera Absorbed or Not with Mycobacteria to the Antigenic Components

Ag. No.	MW (KD)	TB patients (13)			Absorption (4)			Ag. No.	MW (KD)	TB patients (13)			Absorption (4)		
		S	W	N	S	W	N			S	W	N	S	W	N
1	190		13				4	22	60	12	1			4	
2	165	4	9		4	4		23	62	8	5			4	
3	148		12	1		1	3	24	52	8	5			2	2
4	144		9	4		1	3	25	51		7	6			4
5	135		12	1			4	26	48	4	8	1		2	2
6	128		7	6			4	27	44		2	11			4
7	116		6	7		1	3	28	42		4	9			4
8	110	2	10	1		4		29	41	1	10	2			4
9	105	7	6			4		30	38		9	4		4	
10	102		11	2			4	31	36		8	5			4
11	97	2	8	3		1	3	32	35		3	10			4
12	92	1	11	1		1	3	33	33		9	4			4
13	86		7	6			4	34	32			13			4
14	84	4	8	1			4	35	30		1	12			4
15	83	8	5		1	3		36	29		12	1			4
16	81	1	4	8			4	37	28		11	2			4
17	77	3	9	1			4	38	26		2	11			4
18	70		9	4			4	39	24	11	2	1		4	
19	66		6	7			4	40	22		1	12			4
20	65		7	6			4	41	13			13			4
21	63	1	10	2		4		42	11			13			4

Numbers in paranthesis indicate number of cases studied.

Table 3. Reaction Patterns of Sera from Patients with Pulmonary Tuberculosis to the Antigenic Components Separated by SDS-PAGE

Ag. No.	MW (KD)	TB patients						Ag. No.	MW (KD)	TB patients						
		Before tx. (13)			After tx (12)					Before tx. (13)			After tx (12)			
		S	W	N	S	W	N			S	W	N	S	W	N	
1	190		13			8	4	22	60	12	1			6	6	
2	165	4	9			12		23	55	8	5			3	8	1
3	148		12	1		5	7	24	52	8	5			2	7	3
4	144		9	4		4	8	25	51		7	6			1	11
5	135		12	1		7	5	26	48	4	8	1	1	5	6	
6	128		7	6		2	10	27	44		2	11				13
7	116		6	7		1	11	28	42		4	9		2	10	
8	110	2	10	1		8	4	29	41	1	10	2		3	9	
9	105	7	6		1	8	3	30	38		9	4		3	9	
10	102		11	2		5	7	31	36		8	5		2	10	
11	97	2	8	3		6	6	32	35		3	10		1	11	
12	92	1	11	1		9	3	33	33		9	4		4	8	
13	86		7	6		2	10	34	32			13				12
14	84	4	8	1		7	5	35	30		1	12		1	11	
15	83	8	5		2	9	1	36	29		12	1		5	7	
16	81	1	4	8		3	9	37	28		11	2		3	9	
17	77	3	9	1		7	5	38	26		2	11		2	10	
18	70		9	4		5	7	39	24	11	2	10		3	9	
19	66		6	7		2	10	40	22		1	12				12
20	65		7	6		1	11	41	13			13				12
21	63	1	10	2		7	5	42	11			13				12

* S : strong reaction, W : weak reaction, N : no reaction

Fig. 2. Immunoblotting analysis of pooled serum absorbed with sonicated mycobacteria.
 TP : pooled serum of patient 1, 3 6.
 HAT : pooled serum absorbed with sonicated *M. tuberculosis*.
 HAK : pooled serum absorbed with sonicated *M. kansasii*
 HAG : pooled serum absorbed with sonicated *M. seroflaceum*.
 HAB : pooled serum absorbed with sonicated *M. intracellulare*
 HAF : pooled serum absorbed with sonicated *M. fortuitum*.

는 공통적으로 좋은 반응을 보여주었다.

고 찰

Immunoblotting기법은 소량의 (pG단위) 항원이 존재해도 항체와의 반응력을 알아낼 수 있는 방법이라 면역학적 특이성이 높은 항원성분의 동정에 유용함을 알 수 있다. TE를 전기영동후 nitrocellulose sheet에 흡착시켜 Commassie청에 염색한 항원성분들과 항체를 작용시킨 다음 발색시킨 항원들이 숫자적으로나 발색 강도면에서 거의 일치하는 것을 볼 수 있다. 그러나 항원 18(70KD)은 Commassie청에 강하게 염색되나 항체 작

용에서는 약하거나 없다. 이 항원은 결핵균으로 면역시킨 토끼혈청에서는 강한 반응을 나타내었다(별도 실험). 이 항원이 가지고 있는 epitope은 항체 반응력이 숙주에 따라 다르다는 것을 말해준다. 항원 22(60KD), 23(55KD)는 결핵환자의 혈청에 강하게 반응한다. 그러나 타질환환자 및 건강인의 혈청에서는 강도에 있어 약한 반응을 거의 모두 나타내고 있다. 따라서 이들 항원의 epitope은 여러 종류의 균제 항원에 보편적으로 존재하고 있어서 그에 대한 항체가 거의 모든 사람의 혈청에서 검출되는 것으로 추측된다.

Fig 2에서 보편 결핵균 흡수로 전혀 나타나지 않으면서 타항산균 흡수로는 반응 항체가 다 제거되지 않아 반

Fig. 3. Immunoblotting analysis of sera of tuberculosis patients before and after treatment.
 F : sera of patients before treatment.
 T : sera of patients after treatment.

Fig. 4. Immunoblotting comparison between TE and other antigens reacted with pooled serum.
 T1 : *M. tuberculosis* H37Rv cell extract donated from Chaparas SD
 T2 : *M. tuberculosis* Tmc107 cell extract donated from Chaparas SD
 Tc, Tb, Ta : gel filtrated fraction of TE that had been made by Bae, et al.
 TF : concentrated culture filtrate of *M. tuberculosis*.

응이 나타나는 항원은 30(38KD), 39(24KD)이나 이것은 환자 3과 환자 6혈청의 영향 때문일 것으로 본다. 그러나 항원 30(38KD)는 13명의 환자중 9명의 혈청이 반응하여 반응력이 낮지 않음을 알 수 있었다. 또한 Kadival 등이¹⁵⁾ 제조한 MMCA HGT 3a는 오직 *M. tuberculosis*와 *M. bovis*항원 중 38KD에만 작용하였는데, 항원 30이 그것과 같은 분자량이라는 점이 흥미롭다.

타 항산균으로 흡수한 결핵환자 혈청반응에서 나타난 항원의 양상이 거의 일정하다는 점과 타질환환자나 건강인의 혈청에서는 나타나지 않고 결핵환자 혈청에서 반응을 뚜렷이 보였던 항원 5, 12, 17, 24, 37등이 타항산균에 의해 반응항체가 흡수되는 것으로 보아, 사람의 경우 생활주변의 비결핵항산균에 노출된 기회가 많아 그와 같은 항산균의 항원에 대한 항체라고 생각된다.

Fig 4를 보면 같은 *M. tuberculosis*인데 반응양상이 약간 다른 것은 항원 제조 과정, 농도, 균주의 차이등이 원인으로 작용하는 것 같다. 배 등이¹²⁾ 제조한 항원 Tc는 항원 37(28KD), 39(24KD)등이 강하게 나타난 점은 chromatography로 분리할 때 이 성분이 농축되었을 가능성도 있지만 TF도 같은 부위에 강하게 반응하다는 점과 특히 항원 37은 건강인이나 타 질환환자의 혈청에서는 나타나지 않으면서도 13명의 환자 중 11명의 혈청이 반응하여 84.6%의 반응율을 나타내었다는 점 또 치료된 사람 10명중 7명의 혈청에서 반응을 나타내지 않는다는 점으로 보아 비교적 특이성이 있는 것으로 추측된다.

결 론

결핵의 면역학적 진단에 이용될 특이성과 감수성이 높은 *Mycobacterium tuberculosis*의 항원성분을 동정하기 위하여 본 실험을 실시하였다.

초음파로 파쇄한 인형결핵균의 세포추출물을 항원으로 사용하여 immunoblotting방법으로 조사하였다.

3개의 항원성분(135KD, 92KD, 28KD)은 타질환이나 건강인의 혈청과는 반응하지 않고 결핵환자 혈청과는 거의 모두 반응하였으므로 *Mycobacteria*종의 감염 여부를 진단하는데 이용될 가능성이 있다.

2개의 항원성분(38KD, 24KD)는 타항산균으로 흡수시킨 결핵환자 혈청과 반응하였다. 38KD항원은 결핵환자 13명중 9명의 혈청과 반응하였고 24KD 결핵환자를

구별하는데 이용될 가능성이 있다.

4개의 항원성분(41KD, 33KD, 29KD, 28KD)는 결핵환자였다가 치료된 사람의 혈청과 뚜렷이 약하게 반응하거나 반응이 없었다. 이 중 28KD항원은 치료된 사람 10명중 7명의 혈청에서 반응하지 않았으므로 결핵의 완치여부를 판정하는데 이용될 가능성이 있다.

REFERENCES

- 1) 김상재, 배길한, 이승호, 홍영표: 효소결합면역분석법(ELISA)을 이용한 항산균 표면 항원의 상관관계에 관한 연구. 결핵 및 호흡기질환 **33**(3):147-157, 1986
- 2) Daniel TM, Janicki BW: Mycobacterial antigens; a review of their isolation, chemistry, and immunological properties. Microbiol Rev **42**:84-113, 1978
- 3) Seibert FB, Glenn JT: Ftuberculin PPD. Preparation and analysis of a large quantity for standard. Am Rev Resp Dis **44**:9-25, 1941
- 4) Chaparas SD, Baer H: The immunology and chemistry of tuberculin. II. Chromatography with sephadex of the nondialyzable, tuberculinactive constituents of BCG culture filtrate. Am Rev Resp Dis **84**:41-48, 1964
- 5) Kniker WT, Laborde JB: The separation of mycobacterial antigens by ion-exchange chromatography. I. Details of chromatographic and immunologic procedures and results with four strains of *M. tuberculosis*. Am Rev Resp Dis **89**:29-40, 1964
- 6) Janicki BW, Chaparas SD, Daniel TM, Kubica GP, Wright GL, Yee GS: A reference system for antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. Am Rev Resp Dis **104**:602-604, 1971
- 7) 국윤호, 조명제, 황응수, 김익상, 차창룡, 장우현, 이승훈, 김상재, 한용철: *Mycobacterium tuberculosis* 파쇄 추출항원에 대한 단세포군 항체의 생산 및 그 특성에 관한 연구. 결핵 및 호흡기질환 **31**:83-90, 1984
- 8) Engers HD: Results of a WHO-sponsored workshop to characterize antigens recognized by *Mycobacterium*-specific monoclonal antibodies. Infect Immun, **51**:718-720, 1986
- 9) Young RA, Bloom BR, Grosskinsky Grosskinsky CM, Ivanyi J, Thomas D, Davis RW: Dissection of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using recombinant DNA. Proc Natl Acad Sci USA **83**:2583-2587, 1985

- 10) Chen RF: Removal of dfatty acids from serum albumin by charcoal treatment. J Biol Chem **212**:173-181, 1967
 - 11) Lowry OH, Rosebrough NJ, FARR AL, Rndal RJ: Protein measurement with Folin phenol reagent. J Biol Chem **193**:265-275, 1951
 - 12) 배용수, 김상재, 배길한, 이승호 : 항산성균 항원 분획의 혈청학적 활성. 미생물학회지 **242**:377-384, 1986
 - 13) Lanmli UK L Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**:680-685, 1970
 - 14) Lee CY, Huang YS, Hu PC, Gornel V, Menge AC: Analysis of sperm antigen by sodium dodecyl sulfate gel/protein blot radioimmunobinding method. Anal Biochem **123**:14-22, 1982
 - 15) Kadival GV, Chaparas SD: Production, characterization, and species specificity of five monoclonal antibodies to Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol **25**:76-80, 1987
-