

La prueba cutánea de hipersensibilidad aplicada en un parche. Nueva herramienta en el diagnóstico de la tuberculosis

Mauricio A Trujillo-Roldán,* Clara Espitia*

RESUMEN. Un tercio de la población mundial está infectada de manera latente con tuberculosis (TB) y se estima que una de cada diez personas infectadas desarrollarán la enfermedad activa en algún momento de su vida, con una ocurrencia de muerte aproximada al 7%. Estos números plantean un reto para el diagnóstico y control de la enfermedad. La complejidad de esta tarea aumenta cuando se debe diferenciar entre los pacientes con TB activa de aquellos que están infectados. Entre los métodos de diagnóstico más utilizados actualmente, están la prueba cutánea de la tuberculina (PPD), baciloscopia directa, PCR de fluidos corporales y secreciones y cultivo, pruebas que tienen limitaciones. Para un diagnóstico certero, estas pruebas deberán realizarse en conjunto, con los costos y tiempo que esto requiere. En esta revisión, se presenta la evolución del diagnóstico, basado en la capacidad de respuesta celular de los individuos, que se inicia con la utilización de mezclas complejas de antígenos micobacterianos (propuesta por Robert Koch), hasta la introducción de proteínas específicas utilizadas para la medición de la respuesta celular *in vitro*, o directamente en el paciente, aplicada en un parche cutáneo. Tal es el caso de la proteína MPT-64, cuyo potencial diagnóstico en la diferenciación de personas infectadas con TB latente y TB activa ha permitido que actualmente esté en fase III de evaluación con la posibilidad de que su uso sea aprobado por la FDA en este mismo año.

Palabras clave: Tuberculosis, prueba cutánea, MPT-64.

ABSTRACT. A third of the world population is latent infected with tuberculosis (TB), and it is estimated that one in ten people infected, will develop active disease at some point in their life, with a death occurrence of approximately 7%. These numbers propose the challenge for new diagnosis and disease control. The complexity of this task increases when it has to be differentiated between patients with active TB who are infected. Among the most commonly used diagnostic methods are the tuberculin skin test (PPD), direct smear, PCR from body fluids and secretions and culture tests, all of these have limitations. For an accurate diagnosis they must be conducted in conjunction with the implied requirements of cost and time. In this review, we present the evolution of the diagnosis, based on the capacity of cellular response of individuals, starting with the use of complex mixtures of mycobacterial antigens (proposed by Robert Koch), until the introduction of specific proteins used for measurement of cellular response *in vitro* or directly in the patient, applied in a skin patch. Such is the case of MPT-64, whose potential in the diagnosis is based in the differentiation latent TB infection and active TB. This patch is currently in phase III with the possibility of FDA approval in this year.

Key words: Tuberculosis, TB skin test, MPT-64.

* Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Dirección para correspondencia:

Mauricio A Trujillo-Roldán
Unidad de Bioprocessos,
Departamento de Inmunología,
Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Universidad Nacional Autónoma de México, AP. 70228,
México, D.F., CP. 04510, México
Tel.: +52 55 56229192; fax: +52 5 6223369.
E-mail: maurotru@gmail.com, maurotru@biomedicas.unam.mx

Recibido: 4 de agosto del 2009

Aceptado con modificaciones: 5 de septiembre del 2009

La tuberculosis en el mundo y su diagnóstico

Según el reporte 2009 de la Organización Mundial de la Salud (OMS),¹ se calcula que en 2007 hubo 1.3 millones de muertes entre los casos incidentes de tuberculosis (TB) VIH-negativos, y 456,000 entre los VIH-positivos.¹ La TB es causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), siendo esta bacteria el agente causal que presenta el mayor número de muertes en el mundo. Asimismo, se reporta que en 2007 se presentaron 9.27 millones de nuevos casos de TB en el

mando, un número mayor a los 9.24 millones registrados en 2006, con mayores incidencias en India, China, Indonesia, Nigeria y Sudáfrica. De estos nuevos casos se reporta que aproximadamente el 15% son VIH positivos.¹ En México, la incidencia reportada fue de 51,481 casos en 1990 y en 2007 de 21,283 en todas las formas de TB, con 1,017 casos HIV positivos. Estas cifras muestran que hubo una disminución de 61 a 20 casos por cada 100,000 habitantes en 17 años, muy por debajo de los 139 casos por cada 100,000 habitantes de incidencia mundial.¹ Sin embargo, se sabe que un tercio de la población mundial está infectada de manera latente con TB, y se estima que una de cada 10 personas infectadas de manera latente desarrollarán la enfermedad activa en algún momento de su vida con una ocurrencia de muerte aproximada al 7%.² Por otra parte, el incremento de la epidemia de HIV incrementará de manera importante el paso de TB latente a TB activa.^{3,4} Un diagnóstico rápido y oportuno para detectar la TB activa es absolutamente indispensable, a fin de controlar la propagación de la infección.⁴⁻⁷ Desafortunadamente, el diagnóstico de la TB es un proceso largo y complejo que requiere al menos seis o más métodos diagnósticos en combinación para llegar a un resultado confiable.⁵ El método más usado para la identificación de TB activa es de microscopía de bacilos ácido-resistentes de expectoración (baciloscopia o AFB, por sus siglas en inglés), de micobacterias provenientes del esputo.⁸⁻¹² Sin embargo, este método tiene varias limitaciones: no diferencia entre especies de micobacterias y puesto que todas son ácido-alcohol resistentes se requiere de un número mínimo de bacilos (mayor a 10^4) en la muestra inicial y únicamente detecta TB pulmonar.^{10,12} El estándar de oro es el cultivo de los bacilos proveniente de expectoraciones en medio de Lowenstein-Jensen, por su alta especificidad ($> 60\%$ de los pacientes). Sin embargo el lento crecimiento de Mtb (30 a 90 días) bajo condiciones estrictas de laboratorio, no hace de éste un método diagnóstico rápido.^{13,14}

El test cutáneo de intradermorreacción es otra ayuda diagnóstica para detectar la infección tuberculosa mediante la utilización del PPD (derivado proteico purificado). De éste hay dos versiones: la prueba de *Heaf* que utiliza seis pequeñas agujas que introducen una solución conteniendo el PPD en las capas su-

perficiales de la piel con resultados entre 3 y 7 días, y la prueba de *Mantoux* que inyecta una pequeña cantidad de PPD de forma intradérmica con una sola aguja, con resultados en 48 horas. En ambos casos, el enrojecimiento de la piel con una inflamación superior a un tamaño específico se considera positiva.^{2,15,16} Sin embargo, siendo el PPD una mezcla compleja no definida de proteínas no permite distinguir entre enfermedad activa y TB latente. Así mismo, algunos individuos vacunados con BGC o expuestos a micobacterias del medio ambiente pueden dar positivos a la prueba.^{16,17} Estos problemas hacen que el diagnóstico basado en PPD sea de difícil interpretación.

El análisis de la secuencia del genoma de MTB¹⁸ y otras micobacterias permitió la identificación de los antígenos micobacterianos presentes exclusivamente en MTB y no en otras micobacterias.¹⁹⁻²¹ Tal es el caso de las proteínas CFP10 y ESAT6 cuyos genes no están presentes en la cepa vacunal BCG.^{22,23} Así mismo, se pudo establecer que éstas y otras proteínas son inductoras de la respuesta celular.^{22,24-26} Esto permitió que se desarrollaran pruebas diagnósticas basadas en la capacidad de estos antígenos para inducir la proliferación de linfocitos provenientes de individuos expuestos a la micobacteria con la consecuente inducción de interferón gamma, el cual es medido en un ensayo inmuno-enzimático.²⁶⁻³¹ Es así como en 2001, se introdujo la prueba de QuantiFERON®-TB prueba (QFT), fabricada por Cellestis Limited, Australia (www.cellestis.com), la cual fue aprobada por la *Food and Drug Administration* (FDA), como un método diagnóstico para la detección de la infección por Mtb latente.³² Esta prueba requiere de la toma de una muestra de sangre que es incubada con péptidos sintéticos derivados de las proteínas ESAT-6 y CFP-10 de Mtb. Después de 16 a 24 h, se mide la cantidad de interferón gamma.³³ Desafortunadamente, este método no permite diferenciar entre una enfermedad activa y una infección tuberculosa. La TB únicamente se confirma por medio de evaluaciones clínicas y pruebas complementarias (como radiografía de tórax, baciloscopía de esputo y cultivos).

Los parches diagnósticos y la MPT-64

Las pruebas epicutáneas o los parches diagnósticos para tuberculosis activa (PTAT por sus siglas en in-

glés) prometen ser una tecnología que provee alta sensibilidad y especificidad en la identificación de individuos con tuberculosis activa e infecciosa.^{4,34,35} Además, es un método fácil de implementar en países en vías de desarrollo, ya que al igual que el PPD, es una prueba que no necesita de procedimientos invasivos como la toma de muestras o el procesamiento en laboratorio y el resultado es fácil de percibir, ya que la formación de un eritema o vesiculación es suficiente para determinar el resultado como positivo.³⁶⁻³⁸ El parche diagnóstico contenido el antígeno elegido es adherido al brazo del individuo y al igual que el PPD se mide la reacción cutánea. Esta metodología ha sido propuesta para ser utilizada con una única proteína de *M. tuberculosis*, que es la MPT-64 (GenBank Rv1980c, en la cepa H37Rv) ya que algunos estudios demuestran que ésta se produce únicamente en la etapa activa de replicación de Mtb.^{4,39} La MPT-64 y su homóloga para ciertas cepas de *M. bovis* BCG fue reportada por primera vez en 1986 como la proteína MPB-64.⁴⁰ MPB-64/MPT-64 es una proteína de 228 aminoácidos altamente inmunogénica, y es de las más abundantemente secretadas al medio en cultivos replicativos de *M. bovis* y *M. tuberculosis*.⁴ Una de las ventajas de utilizar la MPB64 es el alto nivel de especificidad observado en las pruebas basadas en esta proteína, debido a que la expresión de la misma está disminuida en estados de latencia;⁴¹ a nadado a esto, el gen que codifica para esta proteína fue eliminado durante la atenuación de casi todas las cepas comercialmente disponibles de la vacuna BCG, siendo la BGC-Tokio una de las pocas cepas de la vacuna de BGC que contiene el gen que produce MPB-64.^{40,42}

Una vez aislado el gen codificante para MPB-64 se obtuvieron cepas recombinantes productoras de la proteína (rMPB-64) en *Escherichia coli*^{43,44} y en *M. smegmatis*.^{45,46} Sin embargo, los rendimientos de producción obtenidos fueron muy bajos y no hacían de esta proteína comercialmente viable. Además, los primeros ensayos clínicos se realizaron usando las proteínas recombinantes y MPB-64 obtenida de BGC-Tokio.^{40,44} Se llevaron a cabo nuevos estudios y finalmente se logró obtener una cepa de *E. coli* que de manera heteróloga produce altas concentraciones de la proteína y con la posibilidad de purificación de nivel superior al 98%. Además, se desa-

rrolló la tecnología necesaria para ser producida bajo buenas prácticas de manufactura (BPM) en la industria farmacéutica.⁴

Utilizando la proteína recombinante (rMPB-64) de *E. coli*⁴ se hicieron varios estudios clínicos con pacientes de clínicas de Filipinas.^{34,35} En la primera prueba clínica se utilizaron 53 pacientes con TB activa (confirmada por pruebas en esputo, rayos X y cuadro clínico) y 43 controles sanos pero PPD-positivos. Los resultados mostraron que 52 pacientes presentaron una reacción positiva al parche contenido rMPB64 (de los 53 totales), mientras que todos los controles sanos PPD-positivos dieron negativo al parche (98.1% de sensibilidad y 100% de especificidad).³⁵ En un segundo estudio, también en Manila se aplicó el parche a 62 pacientes, 49 de los cuales dieron positivo en pruebas basadas en su esputo y 13 de estos pacientes TB activos terminaron los 7-8 meses de tratamiento a quimioterapia. Además se utilizaron 28 personas positivas a PPD pero no TB activas,³⁴ quienes nuevamente dieron negativas al parche contenido rMPB-64. De esta primera prueba el parche demostró una sensibilidad del 87.8%, eficacia de 92.9% y especificidad del 100%. De aquellos pacientes que completaron la quimioterapia antes de 4 meses de tratamiento, el resultado fue positivo para todos; al quinto mes de tratamiento la mitad de ellos aún era positiva para el parche y para aquellos que terminaron el tratamiento entre 7 y 8 meses, el resultado fue negativo.³⁴ Al comparar tiempos de respuesta, necesidad de tomar muestra, manejo de la muestra, sensibilidad y especificidad y costos, el parche parece tener más ventajas que desventajas sobre los otros métodos diagnósticos usados cotidianamente (*Cuadro I*).

La compañía Sequella Inc. (www.sequella.com) fundada en 1997 por Carol Nacy, y con únicamente 17 empleados, recibió un apoyo del Instituto de Salud de Estados Unidos (NIH), para que con la colaboración de la Organización Mundial de la Salud, se desarrollara un parche diagnóstico, contenido rMPT-64.^{37,38} En este momento se están llevando a cabo las últimas pruebas de fase III y se espera que este parche esté en el mercado para mediados o finales de 2009.³⁸ En el tiempo de la realización de las pruebas clínicas Sequella ha mejorado la presentación del parche y ahora están en la tercera generación.³⁷ En

Cuadro I. Comparación de algunos de los métodos diagnósticos más utilizados y su comparación con el parche contenido rMPB-64. (Modificado de Sequella Inc.³⁷).

Prueba	Tipo de infección detectada	Toma de muestra	Método de administración	Cuidados en el manejo	Tiempo de respuesta (días)	Costo relativo	Sensibilidad	Especificidad
PPD-Mantoux	Latente	No necesaria	Aguja	No necesaria	2-3	Medio	Baja	Baja
QuantiFERON® Gold	Latente	Sangre total	Tubo de muestreo	Minimizar el manejo de sangre	1	Alto	Alta	Alta
Baciloscopía por AFB	Activa	Esputo	Tubo de muestreo	Procesamiento de laboratorio	3-7	Medio	Media	Media
Cultivo por AFB	Activa	Esputo	Tubo de muestreo	Procesamiento de laboratorio	> 30	Alto	Alta	Alta
Técnicas moleculares (PCR)	Activa	Sangre total o esputo	Tubo de muestreo	Procesamiento de laboratorio	1	Alto	Alta	Alta
Parche-rMPB-64	Activa	No necesaria	No invasiva	No necesaria	>3	Bajo	Alta	Alta

la primera generación era necesario tomar la solución de la proteína rMPT-64 y aplicarla en el parche al momento de pegarla al brazo del individuo. En la segunda generación la proteína pudo ser incorporada al parche en un gel adhesivo y en la tercera generación la prueba consta de un parche dividido en dos partes: una que contiene a la rMPT-64 y la otra PPD que permitirá detectar TB activa y TB latente en el mismo parche diagnóstico.³⁷

En la figura 1 se presenta un resumen de los resultados de las pruebas clínicas reportadas hasta el momento, publicadas por Nakamura^{34,35} y en la página electrónica de Sequella Inc.³⁷ Al hacer un promedio de los resultados hasta ahora reportados,^{34,35,37} de forma independiente a la región o grupo en el que fue realizado, se obtiene una sensibilidad de 87.5% y una especificidad del 100%. Estos resultados son muy prometedores, aunque será necesario llevar análisis clínicos pivotales en cada zona geográfica para determinar la sensibilidad y especificidad en cada región o país.

Perspectivas

Este método diagnóstico, específico y no invasivo promete ser de gran utilidad en la lucha por el control de la tuberculosis. Sin embargo, aún queda un largo camino por recorrer; será necesario determinar la utilidad de estos parches en población abierta de diferentes áreas geográficas, en personas inmunocomprometidas, o en individuos con enfermedades que están bajo tratamientos anti-TNF o interferones para artritis

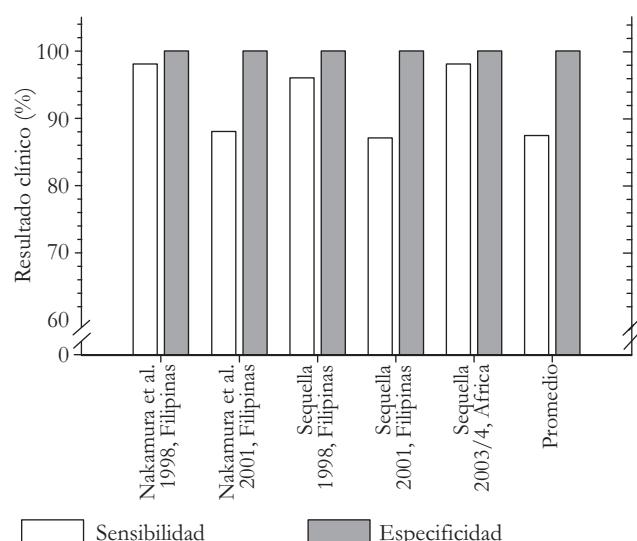


Figura 1. Comparación de los resultados de las pruebas clínicas llevadas hasta el momento con la prueba epicutánea (o de parche) rMPB64.

reumatoide, enfermedad de Crohn, psoriasis y Espondilitis anquilosante, principalmente. También, podrían evaluarse diferentes proteínas inmunogénicas de Mtb producidas de manera recombinante.

Como se puede ver en la figura 1 la mayoría de los estudios se han llevado en las Filipinas con resultados prometedores. Sin embargo, aquellos estudios pivotales en África presentaron menor sensibilidad de la prueba, lo que demuestra que esta prueba da resultados diferentes en diversas comunidades. En Perú, Sequella Inc. y la Universidad Peruana Cayetano Heredia están

terminando pruebas clínicas sobre 600 personas. En México, por su parte, deberán llevarse al menos estu-

dios pívote de Fase III para corroborar la factibilidad de utilizar este método diagnóstico.

Bibliografía

1. World Health Organization. Global tuberculosis control-epidemiology, strategy, financing. WHO Report 2009. 2009. Report No.: WHO/HTM/TB/2009.411.
2. Department of Health / Health Education Authority. BCG Vaccine Factsheet. London: Health Education Authority 1998.
3. Kim JY, Shakow A, Castro A, Vande C, Farmer P. Tuberculosis control. Global Public Goods for Health - A reading companion. World Health Organization 2009.
4. Geisbrecht BV, Nikonenko B, Samala R, Nakamura R, Nacy CA, Sackstede KA. Design and optimization of a recombinant system for large-scale production of the MPT64 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. Protein Expr Purif 2006; 46(1): 64-72.
5. Zellweger JP. Latent tuberculosis: which test in which situation? Swiss Med Wkly 2008; 138(3-4): 31-37.
6. Riska PF, Carlton S. Latent tuberculosis: models, mechanisms, and novel prospects for eradication. Semin Pediatr Infect Dis 2002; 13(4): 263-272.
7. Restrepo BI. New tools for detection of latent tuberculosis. Biomedica 2004; 24(Supp 1): 202-211.
8. El KA, Henry M, Raoult D, Drancourt M. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in the stools of patients with pulmonary tuberculosis. Microbiol. 2009. doi:10.1099/mic.0.026484-0.
9. Watanabe A. Diagnosis of infections with difficulty in isolation and identification of the causative organisms. 3) Acid-fast bacterial infections (caused by *Mycobacterium tuberculosis* or atypical acid-fast organisms). Nippon Naika Gakkai Zasshi 1998; 87(11): 2203-2210.
10. Lipsky BA, Gates J, Tenover FC, Plorde JJ. Factors affecting the clinical value of microscopy for acid-fast bacilli. Rev Infect Dis 1984; 6(2): 214-222.
11. Gao DZ, Fan RL. Smear-positive and culture-negative results in detecting acid-fast bacilli in the sputum and their clinical significance. Zhonghua Jie He He Hu Xi Xi Ji Bing Za Zhi 1986; 9(6): 374-376.
12. Mathew P, Kuo YH, Vazirani B, Eng RH, Weinstein MP. Are three sputum acid-fast bacillus smears necessary for discontinuing tuberculosis isolation? J Clin Microbiol 2002; 40(9): 3482-3484.
13. Wyplosz B, Truffot-Pernot C, Robert J, Jarlier V, Grossset J. The bacteriology of tuberculosis and non-tuberculosis mycobacterial infections. Rev Mal Respir 1997; 14(Suppl 5): S33-48.
14. Witebsky FG, Kruczak-Filipov P. Identification of mycobacteria by conventional methods. Clin Lab Med 1996; 16(3): 569-601.
15. Mallet L, Strozyk WR. Tuberculosis in the elderly: incidence, manifestations, PPD skin tests, and preventive therapy. DICP 1991; 25(6): 650-655.
16. Ciesielski SD. BCG vaccination and the PPD test: what the clinician needs to know. J Fam Pract 1995; 40(1): 76-80.
17. Dennes J, Deeks J, Kunst H et al. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. Health Technol Assess 2007; 11(3): 1-196.
18. Cole ST, Brosch R, Parkhill J et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature 1998; 393(6685): 537-544.
19. Stanford JL. Improving on BCG. APMIS 1991; 99(2): 103-113.
20. Andersen P, Doherty TM. The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. Nat Rev Microbiol 2005; 3(8): 656-662.
21. Gupta UD, Katoch VM, McMurray DN. Current status of TB vaccines. Vaccine 2007; 25(19): 3742-3751.
22. van Pinxteren LA, Ravn P, Agger EM, Pollock J, Andersen P. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. Clin Diagn Lab Immunol 2000; 7(2): 155-160.
23. Arend SM, Ottenhoff TH, Andersen P, van Dissel JT. Uncommon presentations of tuberculosis: the potential value of a novel diagnostic assay based on the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10. Int J Tuberc Lung Dis 2001; 5(7): 680-686.
24. Van-Lume DS, Souza JR, Melo WG, Melo VL, Cabral MM, Rego JC, Schindler HC, Abath FG, Montenegro SM. Preliminary results in the immunodiagnosis of tuberculosis in children based on T cell responses to ESAT-6 and PPD antigens. Mem Inst Oswaldo Cruz 2008; 103(4): 401-404.
25. Ulrichs T, Munk ME, Mollenkopf H, Behr-Perst S, Colangeli R, Gennaro ML, Kaufmann SH. Differential T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6 in tuberculosis patients and healthy donors. Eur J Immunol 1998; 28(12): 3949-3958.
26. Ulrichs T, Anding R, Kaufmann SH, Munk ME. Numbers of IFN-gamma-producing cells against ESAT-6 increase in tuberculosis patients during chemotherapy. Int J Tuberc Lung Dis 2000; 4(12): 1181-1183.
27. Vordermeier HM, Chambers MA, Cockle PJ, Whelan AO, Simmons J, Hewinson RG. Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis. Infect Immun 2002; 70(6): 3026-3032.
28. Ulrichs T, Anding P, Porcelli S, Kaufmann SH, Munk ME. Increased numbers of ESAT-6- and purified protein derivative-specific gamma interferon-producing cells in subclinical and active tuberculosis infection. Infect Immun 2000; 68(10): 6073-6076.
29. Tavares RC, Salgado J, Moreira VB, Ferreira MA, Mello FC, Leung JW, Fonseca Lde S, Spallek R, Singh M, Saad MH. Interferon gamma response to combinations 38 kDa/CFP-10, 38 kDa/MPT-64, ESAT-6/MPT-64 and ESAT-6/CFP-10, each related to a single recombinant protein of

- Mycobacterium tuberculosis* in individuals from tuberculosis endemic areas. *Microbiol Immunol* 2007; 51(3): 289-296.
- 30. Taggart EW, Hill HR, Ruegner RG, Litwin CM. Evaluation of an *in vitro* assay for interferon gamma production in response to the *Mycobacterium tuberculosis*-synthesized peptide antigens ESAT-6 and CFP-10 and the PPD skin test. *Am J Clin Pathol* 2006; 125(3): 467-473.
 - 31. Porsa E, Cheng L, Seale MM, Delclos GL, Ma X, Reich R, Musser JM, Graviss EA. Comparison of a new ESAT-6/CFP-10 peptide-based gamma interferon assay and a tuberculin skin test for tuberculosis screening in a moderate-risk population. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13(1): 53-58.
 - 32. Food and Drug Administration, Center for Devices and Radiological Health. QuantiFERON®-TB - P010033 [Letter]. 2002.
 - 33. Centers for Disease Control and Prevention. National Center for HIV/AIDS VHSaTP. QuantiFERON®-TB Gold Test. 2007.
 - 34. Nakamura RM, Einck L, Velmonte MA, et al. Detection of active tuberculosis by an MPB-64 transdermal patch: a field study. *Scand J Infect Dis* 2001; 33(6): 405-407.
 - 35. Nakamura RM, Velmonte MA, Kawajiri K, Ang CF, Frias RA, Mendoza MT, Montoya JC, Honda I, Haga S, Toida I. MPB64 mycobacterial antigen: a new skin-test reagent through patch method for rapid diagnosis of active tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2(7): 541-546.
 - 36. Tiwari RP, Hattikudur NS, Bharmal RN, Kartikeyan S, Deshmukh NM, Bisen PS. Modern approaches to a rapid diagnosis of tuberculosis: promises and challenges ahead. *Tuberculosis (Edinb)* 2007; 87(3): 193-201.
 - 37. Sequella Inc. Sequella Licensing Opportunity, Biologic, Diagnostic: Pivotal Trials, Therapeutic Focus: Tuberculosis (TB). http://www.sequella.com/docs/Sequella_1sheet09_v1_TBpatch.pdf. 2009. May 5
 - 38. Schneider I. Sequella takes on pernicious enemies, firm seeks to improve diagnosis and treatment of tuberculosis and bacterial pneumonia. *GEN Gen Eng Biotechnol News* 29[1]: 1-1-2009.
 - 39. Oettinger T, Holm A, Mtoni IM, Andersen AB, Hasloov K. Mapping of the delayed-type hypersensitivity-inducing epitope of secreted protein MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995; 63(12): 4613-4618.
 - 40. Harboe M, Nagai S, Patarroyo ME, Torres ML, Ramírez C, Cruz N. Properties of proteins MPB64, MPB70, and MPB80 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 1986; 52(1): 293-302.
 - 41. Betts JC, Lukey PT, Robb LC, McAdam RA, Duncan K. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol* 2002; 43(3): 717-731.
 - 42. Li H, Ulstrup JC, Jonassen TO, Melby K, Nagai S, Harboe M. Evidence for absence of the MPB64 gene in some subsstrains of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 1993; 61(5): 1730-1734.
 - 43. Haga S, Kawajiri K, Niinuma S, Honda I, Yamamoto S, Toida I, Nakamura RM, Nagai S. Effective isolation of MPB64 from a large volume of culture filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo. *Jpn J Med Sci Biol* 1996; 49(1): 15-27.
 - 44. Haga S, Yamaguchi R, Nagai S, Matsuo K, Yamazaki A, Nakamura RM. Delayed-type hypersensitivity to a recombinant mycobacterial antigen, MPB64, in guinea pigs sensitized to *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium bovis* BCG. *J Leukoc Biol* 1995; 57(2): 221-225.
 - 45. Tasaka H, Shigeto E, Matsuo K, Yamaguchi R, Haga S, Yamazaki A, Yamazaki T, Nagai S, Nakamura RM. Secretion of MPB64 antigen by a recombinant clone of *M. smegmatis*: Characterization and application for the diagnosis of tuberculosis. *Scand J Immunol* 1995; 42(4): 487-492.
 - 46. Roche PW, Winter N, Triccas JA, Feng CG, Britton WJ. Expression of *Mycobacterium tuberculosis* MPT64 in recombinant *M. smegmatis*: purification, immunogenicity and application to skin tests for tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 1996; 103(2): 226-232.