

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

PURIFICACIÓN DEL ANTÍGENO 38 kDa DE *Mycobacterium tuberculosis* Y SU POTENCIAL USO EN DIAGNÓSTICO MEDIANTE INMUNOSENSORES PIEZOELÉCTRICOS

Mycobacterium tuberculosis 38 kDa Antigen Purification and Potential Diagnostic Use by Piezoelectric Immunosensors

Paula A. Marín¹, Luz E. Botero², Jaime A. Robledo², Ana M. Murillo², Robinson A. Torres¹, Yeison J. Montagut¹, Elizabeth Pabón³, Marisol Jaramillo⁴.

¹ Escuela de Ingeniería de Antioquia EIA. Universidad CES. Grupo de investigación GIBEC EIA-CES - Laboratorio de Biosensores. Calle 25 Sur n.º 42-73. Envigado, Colombia.

² Corporación para Investigaciones Biológicas CIB. Universidad Pontificia Bolivariana UPB. Grupo de investigación en Bacteriología y Micobacterias. Carrera 72 A n.º 78 B 141. Medellín, Colombia.

³ Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Grupo de investigación Ciencia de Materiales Avanzados, Facultad de Ciencias. Calle 59A n.º 63-20. Medellín, Colombia.

⁴ Escuela de Ingeniería de Antioquia EIA. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Grupo de investigación GIBEC EIA-CES - Laboratorio de Biosensores. Calle 25 Sur n.º 42-73. Envigado, Colombia.

For correspondence. pmarin@eia.edu.co

Received 8th November 2013, Returned for revisión 12th September 2014, accepted 13th October 2014.

Citation / Citar este artículo como: Marín P.A, Botero L.E, Robledo J.A, Murillo A.M, Torres R.A, Montagut Y.J, Pabón E, Jaramillo M Purificación del antígeno 38kDa de *Mycobacterium tuberculosis* y su potencial uso en diagnóstico mediante inmunosensores piezoeléctricos. Acta biol. Colomb. 2015;20(1):129-139. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v20n1.40731>

RESUMEN

Un paso crucial en el desarrollo de un inmunosensor piezoeléctrico para la detección de tuberculosis (TB), es la selección y obtención de los inmunoreactivos empleados en el inmunoensayo y la estrategia para la biofuncionalización del transductor. Diversos estudios han reportado el uso del antígeno proteico 38kDa (Ag38kDa) de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) como un buen biomarcador de la enfermedad y el cumplimiento de las características físicas y bioquímicas para ser inmovilizado por monocapas autoensambladas (SAMs), en la superficie del electrodo de oro de cristales piezoeléctricos. Un inmunosensor piezoeléctrico desarrollado a partir de un antígeno nativo purificado de *Mtb* podría ser un método alternativo simple para la detección de *Mtb* con ventajas de rapidez y reusabilidad, contribuyendo al control y el tratamiento oportuno de la enfermedad. En este estudio se presenta el proceso de purificación del Ag38kDa a partir de proteínas de secreción filtradas de cultivo (CFP) de *Mtb* para ser usado como inmunoreactivo con potencial aplicación en la detección de *Mtb* con inmunosensores piezoeléctricos. Se obtuvieron cristales funcionalizados mediante la técnica modificada de monocapas autoensambladas (SAMs), con el antígeno nativo purificado y CFP. Las superficies biofuncionalizadas fueron caracterizadas cualitativamente con microscopía de fuerza atómica (AFM) para validar las condiciones de optimización del protocolo de inmovilización con antígenos de secreción de *Mtb*. Estos cristales modificados pueden ser acoplados a un sistema de caracterización de un inmunosensor piezoeléctrico para la detección de *Mtb* mediante un inmunoensayo competitivo directo.

Palabras clave: AFM, antígeno 38kDa, biosensores, inmunoensayos, inmovilización, microbalanza de cristal de cuarzo.

ABSTRACT

The selection and procurance of the immunoreagents used in the immunoassay and biofunctionalisation transducer strategy, are a key in the piezoelectric immunosensor development for the detection of tuberculosis (TB). Many have reported the use of 38kDa protein antigen (Ag38kDa) from *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) such as good biomarker of TB disease and compliance with physical and biochemical characteristics to be immobilized by self-assembled monolayers (SAMs), in the gold electrode of piezoelectrics crystals surfaces. A piezoelectric immunosensor developed from purified native antigens of *Mtb* may be an alternative simple method

for detection of *Mtb* with speed and reusable advantages, contributing to the control and early treatment of disease. In this paper, the purification process of Ag38kDa *Mtb* from secretory proteins filtered culture (CFP) from *Mtb* is presented as an immunoreactive with potential application in the detection of *Mtb* by piezoelectric immunosensors. Functionalized crystals were obtained by using the modified self-assembled monolayers (SAMs) technique, with purified native antigen and CFP. The functionalized surfaces were qualitatively characterized using atomic force microscopy (AFM) in order to validate the immobilization protocol optimal conditions for secretion antigens from *Mtb*. These modified crystals may be coupled to piezoelectric immunosensor characterization system for detecting of *Mtb* by a direct competition immunoassay.

Keywords: AFM, antigen 38kDa, biosensors, immunoassay, immobilization, quartz crystal microbalance.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades infecciosas más antiguas conocidas por la humanidad y en la actualidad continúa como uno de los problemas de salud pública más importantes en el mundo, con más de nueve millones de casos reportados al año, de los cuales aproximadamente dos millones de personas mueren (WHO, 2013). Como métodos convencionales de diagnósticos para la detección de la TB pulmonar, se han usado el examen directo de esputo con coloración y el cultivo, para determinar la presencia de la micobacteria. Sin embargo, estos métodos tienen como desventaja el tiempo prolongado para la obtención de resultados, sensibilidad variable, múltiples visitas de los pacientes al centro de salud y una capacitación técnica considerable del personal de salud, lo que limita las posibilidades de detección temprana y tratamiento rápido de la enfermedad (Zenteno, 2003).

En vista de las limitaciones de los métodos convencionales, en los últimos años se han desarrollado métodos alternativos de detección, con el objetivo de mejorar el diagnóstico como es el caso de los inmunoensayos. Los principales retos a los que se enfrentan este tipo de pruebas, están relacionados con la sensibilidad y la especificidad que pueden ofrecer, en parte, porque muchos de ellos son ensayos desarrollados a partir de reactivos de naturaleza recombinante o de baja especificidad por el biomarcador que se quiere detectar. Esto ha motivado el desarrollo de técnicas de purificación y el aislamiento de antígenos del patógeno que son buenos candidatos de biomarcadores para la detección de la enfermedad o monitoreo de la efectividad del tratamiento, entre los cuales se encuentran los antígenos de secreción de *Mtb* (Bala *et al.*, 2002; Devi *et al.*, 2002). Uno de los antígenos de secreción más estudiados, es el antígeno 38kDa (más conocido como b (pab), antígeno 5, antígeno 78, antígeno 38, lipoglicoproteína 38kDa Pst1), que es una lipoglicoproteína de unión a fosfato de liberación lenta al ambiente extracelular, que se ha demostrado es el constituyente mayoritario del sobrenadante de cultivo de esta micobacteria en el medio sintético Sauton's y uno de los antígenos inmunodominantes (Attallah *et al.*, 2003; Steingart *et al.*, 2009).

En respuesta a estos desafíos, han surgido nuevas tecnologías con uso potencial en diagnóstico como los biosensores. Un biosensor es un dispositivo que utiliza

mediadores bioquímicos (bioreceptores) inmovilizados sobre la superficie de un transductor, para detectar la presencia de compuestos químicos o analitos de interés por medio de señales eléctricas, térmicas u ópticas (Montoya *et al.*, 2008). Un biosensor que emplea un anticuerpo o antígeno como elemento de reconocimiento biológico, inmovilizado sobre la superficie del electrodo de oro de un cristal piezoeléctrico (biofuncionalización), es conocido como inmunosensor piezoeléctrico, en el cual el cristal piezoeléctrico está configurado como un microbalanza de cuarzo (QCM, del inglés *Quartz Crystal Microbalance*). Estos transductores biofuncionalizados se pueden acoplar a un sistema de caracterización de señales, donde pequeños cambios en la masa detectada en la superficie del cristal, ocasionadas por las interacciones antígeno-anticuerpo, darán lugar a cambios en la frecuencia de resonancia o fase de la señal con la que se interroga el transductor, estableciendo una relación inequívoca entre las variaciones de la concentración del analito y los cambios de la señal (Bizet *et al.*, 1995; Fengjiao y Zhang, 2002; Montoya *et al.*, 2008).

Siguiendo este modelo, se pueden emplear antígenos de secreción de los microorganismos purificados en el laboratorio, para la biofuncionalización del electrodo de oro del cristal piezoeléctrico, el cual, acoplado a un sistema de caracterización de QCM, podrían ser empleados para la detección de *Mtb*. Un dispositivo de estas características, que combine las ventajas de un inmunoensayo con la fácil implementación de los biosensores, podría constituirse como un método alternativo para el diagnóstico de TB, facilitando la detección temprana y favoreciendo el tratamiento eficaz. (Montoya *et al.*, 2008; Jaramillo *et al.*, 2013)

En este trabajo se presenta el proceso de purificación del antígeno 38kDa nativo (Ag38kDa) a partir de proteínas de secreción filtradas de cultivo (CFP) de *Mtb*. Tanto las proteínas de secreción filtradas de cultivo, como el antígeno purificado, se emplearon para la inmovilización de cristales piezoeléctricos. Las superficies biofuncionalizadas se caracterizaron cualitativamente empleando microscopía de fuerza atómica (AFM), con el fin de encontrar características morfológicas deseables que permitieran establecer su uso potencial para la detección de un antígeno nativo de *Mtb* mediante un inmunosensor piezoeléctrico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de proteínas de secreción filtradas de cultivo de *Mtb*

La purificación del Ag38kDa nativo de *Mtb* se llevó a cabo a partir de CFP de *Mtb*. Para la obtención de filtrados de cultivo se seleccionaron dos cepas de *Mtb*, un aislamiento del sublinaje LAM09 o aislamiento autóctono y la cepa de referencia de *Mtb* H37Rv, suministradas por la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), con el objetivo de comparar entre ellas el rendimiento en la obtención de proteínas de secreción y la purificación del antígeno nativo de interés, bajo las mismas condiciones de cultivo. *Mtb* fue cultivado en medio líquido Sauton's modificado, como se describe en Parish y Stoker, 2001 y Cardoso *et al.*, (2004) e incubada a 37 °C durante tres a cuatro semanas en agitación suave. Los bacilos se recuperaron por centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos a 4 °C para hacer los cultivos sucesivos. El sobrenadante (enriquecido con proteínas de secreción) se filtró en su totalidad usando membranas estériles de 0,45 µm (GVS Ref.: A004FI01) y 0,20 µm (GVS Ref.: A002DI01). Las proteínas presentes en el filtrado de cultivo se precipitaron con (NH₄)₂SO₄ (Merck, Ref. 1012175000) en gradiente de 50% y 80% de saturación. El material recuperado se dializó con solución tamponada de fosfatos (PBS 50 mM/25 mM) adicionando inhibidores de proteasas y se liofilizó para su almacenamiento y posterior uso. Para determinar la cantidad de proteínas totales recuperadas, el material liofilizado se resuspendió en agua ultrapura tipo 1 (MilliQ®) y se realizó cuantificación de proteínas utilizando el kit comercial (Qubit® Protein Assay Kits Invitrogen, Ref. Q32866), posteriormente se identificó el perfil de proteínas y su inmunoreactividad mediante SDS-PAGE y Western Blot (WB) como se describe en Coligan *et al.*, (1995), determinando el rendimiento por cada lote y cepa en la cantidad de la proteína de 38kDa de interés. Todos los lotes de proteínas obtenidos por cepa se unificaron en lotes únicos, mediante una mezcla homogénea y conservando cadena de frío. Nuevamente lotes únicos se liofilizaron (Liofilizador Centricol Syclon 18) tras la adición de inhibidor de proteasas y se almacenaron a 4°C.

Purificación del antígeno 38kDa nativo de secreción a partir de un aislamiento autóctono de *Mtb*

El Ag38kDa se purificó a partir de CFP empleando cromatografía de afinidad (Aminolink® Immobilization Kit Pierce, Ref. 20381). Las columnas cromatográficas se prepararon siguiendo las recomendaciones del fabricante y se empleó para el acople con las perlas de agarosa una concentración de 0,89 mg/mL del anticuerpo monoclonal Myc31 (AcMoMyc31). Este anticuerpo monoclonal se obtuvo mediante la tecnología de hibridomas como se describe a continuación y su afinidad por el antígeno nativo en las muestras de CFP se evaluó un inmunoensayo de ELISA indirecto empleando 100 µL de CFP para tapizar los microplatos (Corning Ref: 3590).

Producción del anticuerpo monoclonal Myc31

Se inmunizaron cinco hembras BALB/c mediante inyección intraperitoneal con el antígeno proteico rAgMyc38kDa (MyBioSource MBS538250), de origen recombinante de *Mtb*. La fusión celular se llevó a cabo siguiendo el método propuesto por Nowinski *et al.*, (1979). Las poblaciones celulares de linfocitos procedentes de ratones que respondieron al proceso de inmunización y de mieloma, se mezclaron en una proporción 5:1 (linfocito:mieloma) y se fusionaron mediante la adición de polietilenglicol (PEG) 1500. Se les añadió medio de selección suplementado con hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT) y luego se sustituyó por el mismo medio sin aminopterina (HT). Entre ocho y diez días después de la fusión celular, los sobrenadantes de cultivo se analizaron mediante ELISA para detectar la presencia de anticuerpos capaces de reconocer al antígeno proteico recombinante de *Mtb*. Los hibridomas seleccionados se clonaron siguiendo el procedimiento de dilución límite utilizando medio HT. Los anticuerpos se purificaron directamente a partir de los sobrenadantes de cultivo mediante precipitación con (NH₄)₂SO₄ al 50% de saturación. Finalmente, los anticuerpos precipitados se almacenaron a 4 °C y se evaluaron finalmente mediante ELISA empleando CFP de *Mtb*, para seleccionar el anticuerpo con mayor afinidad por el Ag38kDa nativo presente en los antígenos totales. El anticuerpo monoclonal que presentó mayor afinidad por el antígeno recombinante comercial y el antígeno nativo fue el anticuerpo Myc31, su denominación específica fue dada de acuerdo al animal de procedencia, al número de hibridomas clonados y al nombre del antígeno con el cual se inmunizaron las ratonas (rAgMyc38kDa).

Biofuncionalización de cristales piezoeléctricos con antígenos de secreción de *Mtb*

Para la inmovilización de antígenos totales de secreción de *Mtb* y del Ag38kDa nativo purificado, se tomó como referencia el protocolo descrito por March *et al.*, (2009). En este protocolo se empleó para la inmovilización 10 mg/mL del conjugado del hapteno TCP (3, 5, 6-tricloro-2-piridinol) nombrado como (BSA-TS1) (Manclús y Montoya, 1996), siendo en este caso la proteína BSA la molécula que se inmoviliza en el transductor. Teniendo en cuenta que las características físicas y bioquímicas entre la BSA (Bovin Serum Albumin) y el Ag38kDa de *Mtb* son diferentes y que de éstas depende una adecuada inmovilización sobre sustratos de oro empleando SAM, se realizaron dos modificaciones al protocolo guía para la optimización del proceso con proteínas de secreción de *Mtb*, a saber: 1) el uso de dos tipos de alcanotioles, uno de 16 carbonos, el ácido 16-mercaptohexadecanoico (MHA) y otro de ocho carbonos, el ácido α-lipoico o ácido tióctico (AT), para la formación de la primera monocapa en contacto con el oro y 2) el uso de dos concentraciones de proteína diferente para la inmovilización, 2,97 mg/mL que corresponde a la

concentración de proteínas de secreción totales de CFP para la cepa LAM09 autóctona y una muestra concentrada de estas proteínas por ultrafiltración (filtros Amicon® Ultra 0.5) a 10 mg/mL, como lo indica el protocolo original.

El proceso de inmovilización de proteínas sobre sustratos de oro empleando SAM se llevó a cabo en varias etapas. La superficie de oro del cristal de cuarzo se lavó con solución piraña (H_2SO_4 concentrado y H_2O_2 al 30%, 3:1 v:v) durante cinco minutos a temperatura ambiente. El cristal se puso en agitación con una disolución 10 mM del alcanotiol seleccionado disuelto en etanol durante toda la noche. La activación del grupo carboxílico del alcanotiol en un reactivo intermedio (éster de N-hidroxi-succinimida), se llevó a cabo utilizando una mezcla de N-hidroxi-succinimida (NHS) 50 mM y clorhidrato de carbodiimida (EDC) 200 mM en agitación durante cuatro horas. La inmovilización de las proteínas se hizo adicionando 60 μ L de la muestra sobre la superficie del electrodo, durante cuatro horas a temperatura ambiente. Finalmente, se añadió etanolamina al 10% en tampón borato durante una hora, con el fin de bloquear los sitios activos restantes en la superficie para evitar reacciones inespecíficas (March *et al.*, 2009).

Caracterización topográfica de cristales piezoeléctricos mediante AFM

La estandarización de los parámetros de configuración requeridos, para la caracterización topográfica de superficies de oro biofuncionalizadas con SAM de proteínas mediante AFM, se llevó a cabo realizando estudios de caracterización previa empleando cristales de cuarzo biofuncionalizados con: Albumina de suero bovino (BSA) (Jaramillo *et al.*, 2013), el conjugado del hapteno TCP, BSA-TS1 (Manclús y Montoya, 1996) y CFP de *Mtb*. En la Tabla 1 se resumen

Tabla 1. Parámetros de configuración de un AFM y características de la sonda para la caracterización topográfica de superficies activadas mediante SAMs con antígenos de secreción de *Mtb*.

Parámetro	Características
AFM	NanoSurf EasyScan 2 FlexAFM
Modo de exploración	Dinámico, tappin en modo de contraste de fase.
Sonda	ACSTA AppNano. Material: Si, 0,01-0,025 ohm/cm. Cantiléver: L: 150 μ m, W: 28 μ m, T: 3 μ m. Radio:<10 nm, H: 14-16 μ m, F: 150 kHz, k: 7,8 N/m. Recubrimiento: Al. Piramidal.
Tamaño de la imagen	Áreas: 10 μ m ² , 5 μ m ² , 1 μ m ² .
Resolución	256 líneas x256 líneas
Controlador Z	P-Gain: 1001 I-Gain: 1001 D-Gain: 0, se ajusta durante la medición. Set point: 50%
Amplitud libre de vibración	200-300 mV

los mejores parámetros de configuración encontrados para un microscopio de fuerza atómica y las características que debe tener la sonda, para la exploración de superficies de oro biofuncionalizadas con antígenos proteicos mediante SAMs.

RESULTADOS

Purificación del antígeno de secreción 38kDa

Teniendo en cuenta la cantidad de proteína requerida para el proceso de inmovilización de 10 mg/mL (March *et al.*, 2009), se unificó el material proteico proveniente del filtrado de cinco lotes de cultivo de *Mtb* por cada cepa. Con el proceso de obtención de proteínas de CFP desarrollado en este estudio se produjo una muestra de antígeno de proteínas CFP totales de 2,97 mg/mL de concentración a partir de la cepa LAM09 y otra muestra de 3,20 mg/mL de concentración de CFP a partir de la cepa H37Rv. Para obtener estas muestras, se inoculó un total de volumen de cultivo líquido Sauton's promedio de 2,5 L y se obtuvo aproximadamente 1,5 L de filtrado de cultivo por cada aislamiento, en un periodo aproximado de cinco meses.

En cada una de estas muestras se identificó el perfil de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE al 12% y posterior coloración de plata metenamina (información no mostrada), comparando el perfil de pesos moleculares en cada una de las muestras por cepa. En los geles se observó un patrón de proteínas de peso molecular en un rango entre 19kDa y 200kDa, observándose que, para la muestra unificada correspondiente a los filtrados de cultivo de la cepa de *Mtb* H37Rv, se obtuvo en general una mayor cantidad de antígeno total enriquecido en proteínas de alto peso molecular, con respecto a al aislamiento LAM09. Estos resultados son consistentes con el perfil reportado por Espitia *et al.*, (1989), en el análisis de proteínas de secreción de CFP de *Mtb* H37Rv, las cuales se encontraron en la región de peso molecular entre 19kDa y 120kDa. Para los dos lotes únicos de antígenos de CFP valorados, se observó una banda de peso molecular correspondiente con el antígeno nativo de secreción de interés en 38kDa.

Los geles de poliácridamida se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para la valoración de la inmunoreactividad del antígeno mediante WB, empleando el anticuerpo monoclonal Myc31 como anticuerpo primario. En la Figura 1., se puede observar una banda de reacción en 38kDa, sugiriendo que esta proteína es reconocida por el anticuerpo monoclonal. Además se observó, que el Ag38kDa proveniente de la cepa de *Mtb* H37Rv, fue reconocido por el anticuerpo monoclonal Myc31 hasta en una dilución de 1:100, indicando que esta cepa, no solo produce una mayor cantidad de proteínas de secreción, en el gel, sino una mayor cantidad del antígeno de secreción de 38kDa que el producido por el aislamiento LAM09, bajo las mismas condiciones de cultivo. En el gel se observan las diferentes bandas de reacción positiva con el anticuerpo, tanto en el antígeno concentrado como a diferentes diluciones.

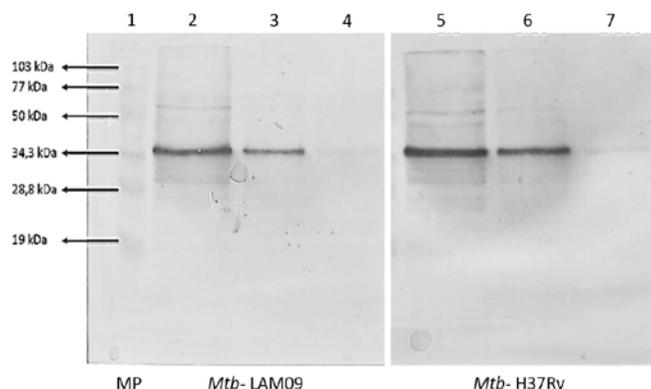


Figura 1. Valoración por Western blot del lote único de antígenos de secreción filtrados de cultivo (CFP) de *Mtb* (cursiva) con el anticuerpo monoclonal Myc31. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular (MP). Los carriles 2, 3 y 4 corresponden a las diluciones de CFP de la cepa LAM09 1:1, 1:10 y 1:100. Los carriles 5, 6 y 7 corresponden a las diluciones de CFP de la cepa H37Rv respectivamente.

Cromatografía de afinidad

Para la purificación del antígeno nativo de secreción de *Mtb* a partir de las muestras únicas de CFP de ambas cepas, se seleccionó el anticuerpo monoclonal Myc31 para el acople con las perlas de agarosa de la columna cromatográfica. Para la selección se empleó inmunoensayo tipo ELISA indirecto (no se muestran los resultados), donde se probaron los 12 anticuerpos monoclonales obtenidos, frente a las muestras únicas de CFP de cada cepa. El ensayo reveló que el AcMoMyc31 presentó mayor afinidad por el Ag38kDa presente en estas muestras de antígenos crudos de secreción.

Con la eficiencia de acoplamiento alcanzada durante el proceso de acople del anticuerpo a la columna cromatográfica del 48% y siguiendo el protocolo del fabricante para la purificación del antígeno empleando las columnas, se obtuvieron dos muestras de 500 μ L del antígeno de secreción de *Mtb* enriquecida en Ag38kDa, con 54,62 μ g/mL de proteína para el aislamiento LAM09 y 100,73 μ g/mL para la cepa de *Mtb* H37Rv. Teniendo en cuenta la concentración de las muestras purificadas y la cantidad de proteínas CFP empleadas como materia prima -17,82 mg para el aislamiento LAM09 y 22,84 mg para la cepa de referencia H37Rv-, se obtuvo un

rendimiento del proceso de cromatografía para la purificación del Ag38kDa nativo de 0,3% y 0,4% en la muestra proveniente de LAM09 y H37Rv respecto a las muestras iniciales del aislamiento (tabla 2.). El nivel de pureza de las muestras se determinó mediante SDS-PAGE (Fig. 2A) y la reactividad de la proteína se valoró con WB (Fig. 2B). Como se observa en el gel, se obtuvo una mayor cantidad de Ag38kDa para la cepa de referencia H37Rv y en ambas muestras el antígeno fue reactivo frente al anticuerpo monoclonal Myc31.

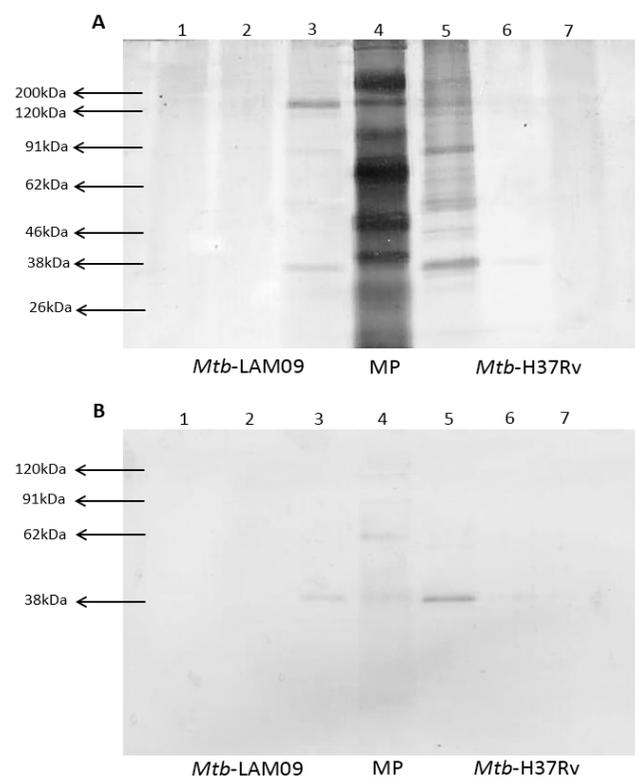


Figura 2. Valoración del antígeno proteico de secreción enriquecido en Ag38kDa de *Mtb* (Ag38kDa*). A) Gel de electroforesis SDS-PAGE al 12% y B) Western blot con anticuerpo monoclonal Myc31. Los carriles 1, 2, 3 corresponden a las diluciones 1:100, 1:10 y 1:1 de Ag38kDa* del aislamiento LAM09. El carril 4 corresponde al marcador de peso molecular (MP). Los carriles 5, 6 y 7 corresponden a las diluciones 1:100, 1:10 y 1:1 del Ag38kDa* de la cepa de referencia H37Rv respectivamente.

Tabla 2. Características de purificación del antígeno 38kDa (Ag38kDa) nativo obtenido del aislamiento autóctono LAM09 y de la cepa de *Mtb* H37Rv.

Fracción	Vol.Cult (L)	Vol. Filt (L)	Vol. Resus (mL)	Prot. real		Prot. teórica		(%)
				mg/mL	mg	mg/mL	mg	
CFP LAM09**	2,5	1,5	6	2,97	17,82			
CFP H37Rv			7	3,20	22,40			
Ag38kDa* LAM09			0,500	0,055	0,027	1,070	0,530	0,3
Ag38kDa* H37Rv			0,500	0,101	0,050	1,340	0,670	0,4

**LAM09: Aislamiento de *Mtb* número nueve en América Latina. Vol.Cult: Volumen Total Cultivado. Vol.Filt: Volumen total filtrado. Vol. Resus: Volumen resuspendido. Prot.real: Proteína total real. Prot.teórica: Proteína total teórica.

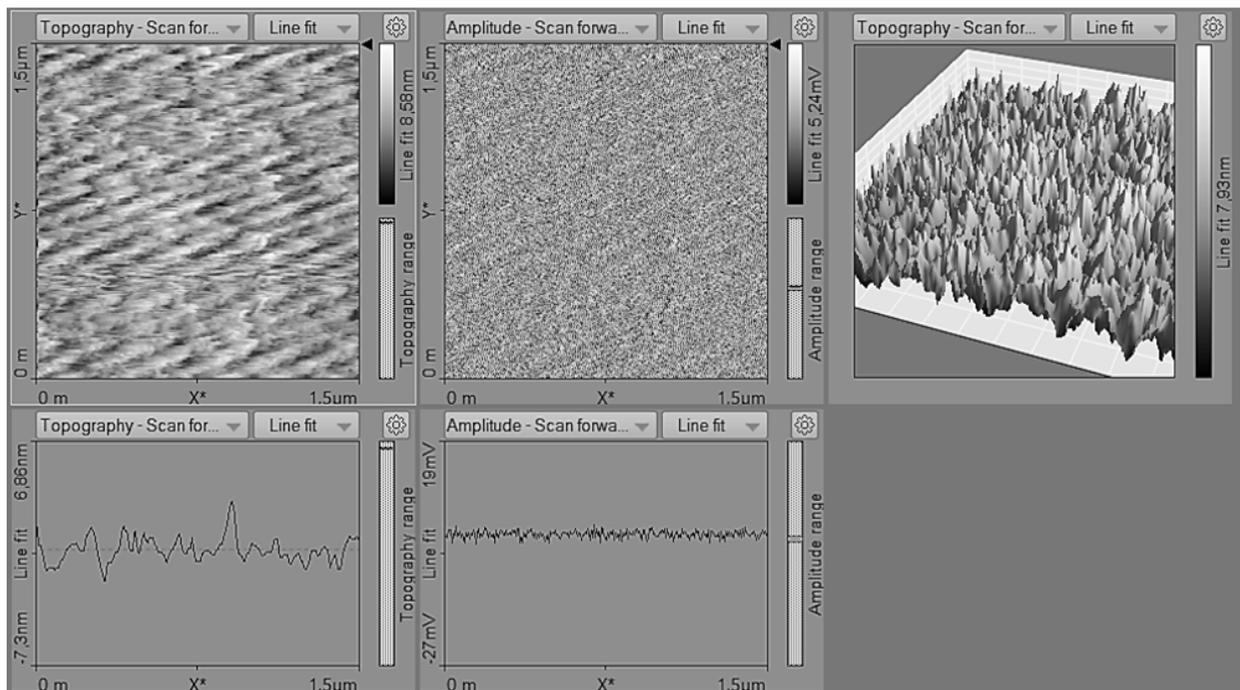
Funcionalización con CFP de *Mtb* del aislamiento autóctono LAM09

En vista de que la proteína BSA y los antígenos de secreción de *Mtb*, incluyendo el antígeno 38kDa, podrían tener características físicas y bioquímicas diferentes y necesarias para aumentar el rendimiento de las SAMs, tales como, diámetro, peso molecular y cantidad de grupos lisina (Poderys *et al.*, 2011), se realizaron dos variantes importantes al protocolo de inmovilización de referencia. Se esperaba encontrar una combinación alcanotiol/concentración de proteína que ofreciera las mejores características superficiales, en cuanto a homogeneidad, orientación y densidad, para la inmovilización del Ag38kDa sobre electrodos de oro de cristales piezoeléctricos. El protocolo de inmovilización se optimizó empleando dos concentraciones de CFP del aislamiento LAM09 y dos tipos de alcanotioles diferentes. Se obtuvieron en total cuatro cristales funcionalizados y las imágenes topográficas junto con los parámetros obtenidos, se compararon con las imágenes topográficas del electrodo de oro desnudo (Fig. 3A).

Para todos los casos, se obtuvieron superficies con topografías superficiales similares, parecidas a pequeños islotes de puntos brillantes de forma piramidal distribuidos al azar, homogéneas en forma y tamaño y con orientación definida (Fig. 4A), lo que indica que para todas las

combinaciones empleadas durante la inmovilización, estas características superficiales se satisfacen. Estos islotes observados, son comunes en la caracterización morfológica de superficies biofuncionalizadas mediante SAMs, sin embargo las formas visualizadas pueden variar de acuerdo a la molécula inmovilizada. Por ejemplo, en el caso de la funcionalización de sustratos con hemoglobina, empleando SAMs mixtas, estos puntos son circulares según Wang *et al.*, (2010), pero cuando se emplean antígenos de patógenos, componentes de pared celular, partes de bacterias y virus o anticuerpos para la inmovilización, estos puntos pueden ser piramidales, como lo indican los resultados presentados por Owen *et al.*, (2007) y como se observaron en este estudio donde se emplearon antígenos de *Mtb* para la funcionalización de electrodos de oro.

Por otro lado, se encontró una mayor rigidez de la capa funcionalizada cuando se inmovilizó con el alcanotiol MHA a una concentración de 2,97 mg/mL de CFP proveniente del aislamiento LAM09 (Fig. 4), lo que indica una mayor densidad de moléculas fuertemente adheridas a la superficie del electrodo. Los parámetros analizados en este caso, son la fase (no se muestra) y la amplitud de la señal (Fig. 4B) proporcionada por el cantiléver durante la exploración de la superficie. A mayor desfase y menor amplitud, respecto a los obtenidos en las imágenes del electrodo de oro desnudo

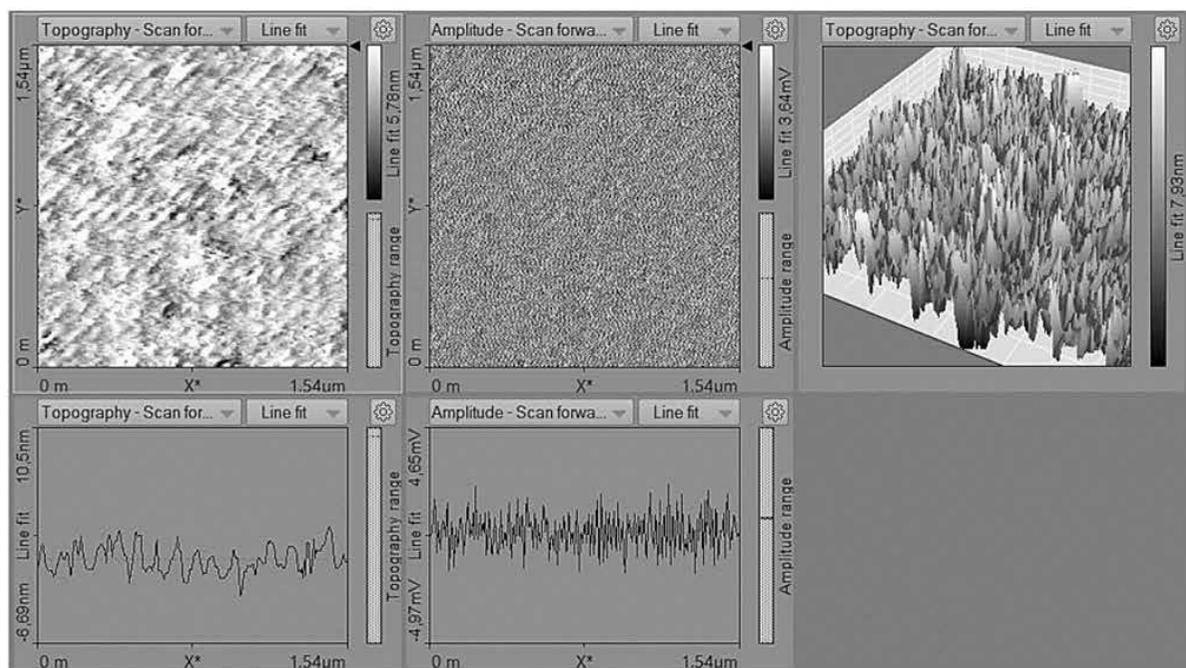


A. Caracterización topográfica.

B. Caracterización en amplitud.

C. Caracterización en 3D.

Figura 3. Caracterización topográfica en contraste de fase del electrodo de oro de un transductor piezoeléctrico sin funcionalización, en un área de 1,5 μm².



A. Caracterización topográfica.

B. Caracterización en amplitud.

C. Caracterización en 3D.

Figura 4. Caracterización topográfica en contraste de fase del electrodo de oro biofuncionalizado con CFP del aislamiento LAM09 a 2,97 mg/mL con el ácido 16-mercaptohexadecanoico (MHA) en un área de $1,54 \mu\text{m}^2$.

(Fig. 3B), existe mayor densidad de moléculas inmovilizadas sobre la superficie.

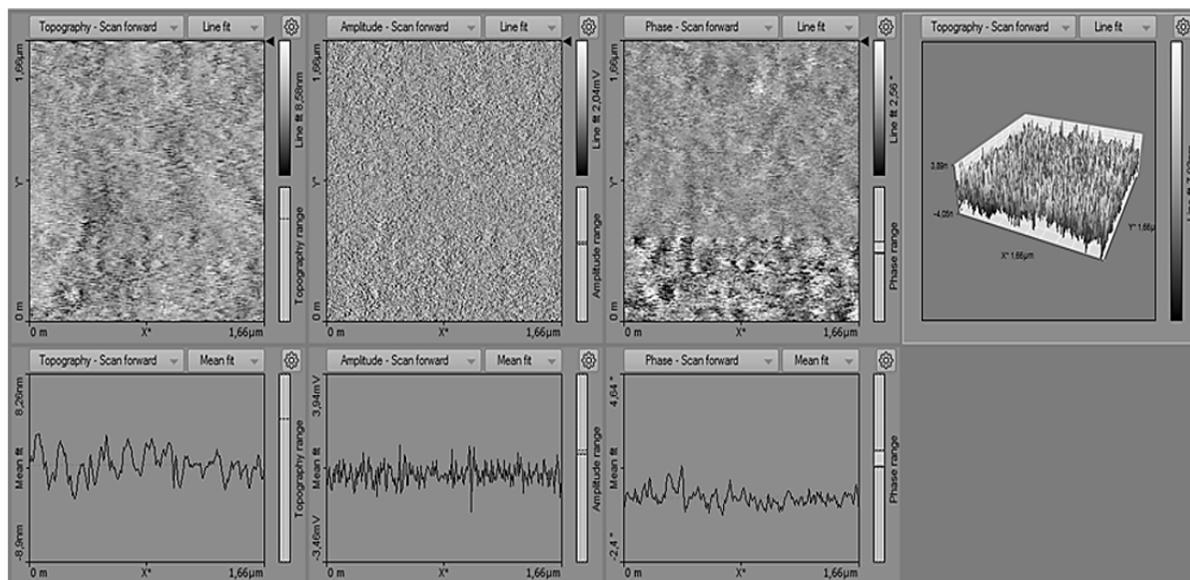
Estos resultados son consistentes con lo reportado en el trabajo de Baldrich *et al.*, (2008), en el que se analizan los niveles de adsorción de anticuerpos anti-HRP sobre superficies de oro funcionalizadas mediante SAMs, a partir de mercaptotioles de diferente longitud. En su estudio, los autores encontraron que se obtiene un mayor nivel de adsorción de las biomoléculas cuando se inmovilizan sobre las SAMs formadas a partir de alcanotioles con cadenas carbonadas más largas.

Funcionalización con el antígeno de secreción purificado

Del proceso de purificación del Ag38kDa empleando cromatografía de afinidad, se obtuvo una muestra de proteína de secreción enriquecida en Ag38kDa nativo a una concentración de $54,62 \mu\text{g/mL}$, proveniente del aislamiento autóctono LAM09. De este modo, para alcanzar la cantidad de proteína encontrada en el ensayo de estandarización del protocolo de inmovilización ($2,97 \text{ mg/mL}$), la muestra purificada se concentró por ultrafiltración, obteniéndose una muestra de $60 \mu\text{L}$ a una concentración máxima de $819 \mu\text{g/mL}$ aproximadamente, la cual se empleó para la inmovilización de un cristal piezoeléctrico. Las imágenes de la caracterización topográfica con AFM se muestran en la (Fig. 5).

Contrario a lo obtenido en la caracterización de cristales funcionalizados con CFP, en este caso no se observaron islotes de puntos brillantes característicos, ni los cambios en la amplitud y fase esperados correspondientes con una biocapa rígida. Por tanto, se hizo necesario comparar estos resultados con las imágenes del electrodo de oro lavado con solución piraña (no se muestra imagen), que corresponde a la etapa inicial del proceso de inmovilización. Se encontró que la superficie de oro funcionalizada con la proteína de secreción enriquecida en el Ag38kDa, es similar a la imagen de la superficie del electrodo de oro lavado, en todos los parámetros obtenidos con el AFM, esto es, topografía, amplitud y fase, lo que podría indicar que para el área escaneada, no se encontraron moléculas inmovilizadas.

Lo anterior puede deberse a varios factores físicos y químicos de la muestra. En primer lugar, no se conoce, por estudios de caracterización físico-química, cual es la cantidad mínima de grupos amino que tiene el antígeno 38kDa, los cuales pueden estar en mayor cantidad dentro del aminoácido lisina, para la formación de enlaces covalentes con la superficie previamente activada. En segundo lugar, el tamaño de la proteína en la muestra enriquecida purificada, donde predomina el 38kDa, es en promedio inferior a las proteínas de CFP, que como se discutió en apartados previos, en su mayoría presentan una proporción de pesos moleculares superior a 38kDa. En



A. Electrodo biofuncionalizado.

B. Electrodo lavado con solución piraña.

Figura 5. Caracterización topográfica del electrodo de oro biofuncionalizado con proteína de secreción enriquecida en Ag38kDa* purificado de CFP LAM09 a 819 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con MHA en un área de $1,66 \mu\text{m}^2$.

tercer lugar e igualmente importante, está la concentración de la muestra empleada para la inmovilización, que para el caso de la funcionalización de cristales piezoeléctricos con CFP, fue alrededor de 3 mg/mL , lo cual permitió tener una mayor relación de moléculas por unidad de área, aumentando la probabilidad de encontrar mayor número de partículas en las áreas escaneadas; caso contrario a la superficie funcionalizada con la muestra de proteína de secreción enriquecida, la cual se inmovilizó a una concentración de 819 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con lo cual, la probabilidad de encontrar proteínas en el área escaneada de $1 \mu\text{m}^2$ fue mucho menor. Todos estos factores son si lugar más favorables en el caso en el cual se empleó la muestra de CFP del asilamiento LAM09 para la biofuncionalización de cristales piezoeléctricos, permitiendo una modificación de la superficie con características topográficas deseables y detectables mediante estudios de AFM cualitativo.

Para validar la inmovilización en este caso, se deben realizar estudios cuantitativos como la espectroscopia de fuerza con AFM empleando una sonda funcionalizada con un anticuerpo específico, como el desarrollado por Luppá *et al.*, (2001), en el cual se reportan las gráficas de fuerza vs distancia en diferentes puntos de una superficie de oro funcionalizadas mediante SAMs con BSA o mediante un sistema de caracterización de señales de un biosensor piezoeléctrico, para relacionar los cambios de frecuencia del sensor ocasionados por los cambios de masa en su superficie debidos a interacciones antígeno anticuerpo, tal y como se reporta en March *et al.*, (2009).

DISCUSIÓN

Un paso crucial en el desarrollo de un inmunosensor piezoeléctrico comprende, la selección y obtención de los inmunoreactivos empleados en el ensayo de detección y la funcionalización del transductor piezoeléctrico mediante la inmovilización de uno de estos inmunoreactivos sobre la superficie del transductor.

En este estudio se seleccionó el Ag38kDa para funcionalizar el transductor de un inmunosensor piezoeléctrico con potencial aplicación en la detección de un antígeno nativo de *Mtb*. Tal y como lo reportan Walzl *et al.*, (2008) y McNerney *et al.*, (2012), el antígeno 38kDa es usado frecuentemente en el desarrollo de métodos de diagnóstico serológicos, ya que, el nivel de anticuerpos anti-38kDa es mayor en los pacientes con tuberculosis activa y altas concentraciones de estos anticuerpos están asociadas con la enfermedad avanzada. Adicionalmente, cuando se aplica tratamiento con quimioterapia, estos niveles suelen aumentar, indicando la inmunodominancia del antígeno en las diferentes etapas del ciclo de vida del patógeno, el progreso de la enfermedad e incluso el avance del tratamiento. Sin embargo estudios desarrollados por Gennaro (2000) y Walzl *et al.*, (2008), indican que la detección serológica de anticuerpos no es un método preciso para la detección de TB, debido a las variaciones individuales en la respuesta inmune frente a diferentes antígenos de la micobacteria, así como a la respuesta heterogénea frente al mismo antígeno entre diferentes poblaciones endémicas. Bajo esta premisa, los inmunoensayos para el diagnóstico de TB basados en

la detección de antígenos del patógeno, puede ofrecer un diagnóstico certero, ya que no son afectados por las variaciones propias de la respuesta inmune.

A diferencia de los trabajos desarrollados por Fengjiao *et al.*, (2002) y Nagel *et al.*, (2008), en los cuales se inmovilizan anticuerpos directos en inmunoensayos para la detección de antígenos o componentes de la pared de *Mtb*, los transductores funcionalizados en este estudio, podrían servir como plataforma para la detección de antígenos de *Mtb* bajo un formato de inmunoensayo directo competitivo. Esto representa una ventaja substancial en el aumento de la reusabilidad de estos dispositivos ya que, la inmovilización de anticuerpos requiere generalmente de un ligando adicional como la proteína A o G para lograr la unión covalente y orientación de los anticuerpos sobre la superficie del transductor, aumentando los costos del proceso de inmovilización convencional, con una pérdida acelerada de la capacidad reactiva de la interfaz biológica. Esto debido en parte, a la degradación del anticuerpo o pérdida del complejo anticuerpo - proteína A inmovilizada, por el uso de soluciones de lavado en los procesos de regeneración de la superficie. Contrario a cuando se emplean antígenos proteicos para la funcionalización como en la presente investigación, ya que estos pueden ser más resistentes a la degradación durante los lavados en la regeneración de la superficie que los anticuerpos y además no requieren el uso de un ligando adicional que podría incrementar los costos de la inmovilización, tal como la proteína A o G.

Actualmente otro inmunosensor piezoeléctrico para la detección de un biomarcador de TB está siendo desarrollado en Colombia por Jaramillo *et al.*, (2013) empleando un formato directo competitivo. En esta propuesta se inmovilizó antígeno 38kDa recombinante de *Mtb* sobre la superficie del electrodo de oro de un transductor piezoeléctrico empleando SAMs. Los avances obtenidos en este trabajo dieron a conocer la necesidad de diseñar la interfaz biológica de estos dispositivos a partir de antígenos nativos purificados de la micobacteria, con el objetivo de aumentar la sensibilidad de la prueba de detección y proporcionar una fuente importante de inmunoreactivos, para el desarrollo de inmunoensayos estándar requeridos en la validación de estos dispositivos. Adicionalmente, es necesaria la optimización del protocolo de inmovilización propuesto por March *et al.*, (2009) implementado en este trabajo, para la funcionalización del transductor piezoeléctrico específicamente con el antígeno 38kDa recombinante.

El proceso de obtención de proteínas de secreción filtradas de cultivo desarrollado, permitió la obtención de una cantidad importante de CFP debido a procesos de unificación y liofilización sucesivos que no habían sido reportados en otros trabajos. Con respecto al trabajo de Young *et al.*, (1986), en el que se usó la técnica de

cromatografía de afinidad para la purificación del Ag38kDa de CFP de *Mtb*, obteniendo una muestra purificada final de 8,80 µg/mL con un rendimiento del 0,7%, en nuestro caso se logró obtener una mayor cantidad y concentración del material eluido, antígeno proteico enriquecido en 38kDa, entre 54 µg/mL y 100 µg/mL, lo que representa un rendimiento entre 0,3% y 0,4%, con aproximadamente la misma cantidad de anticuerpo acoplado, indicando que, tanto el kit empleado como el protocolo de purificación desarrollado aumentaron la captura del analito. Este aumento en la cantidad y concentración de material eluido se debe en parte a que la muestra de CFP empleada como materia prima estaba muy concentrada y se consiguió un importante volumen de muestra inicial, además en el protocolo de purificación se incluyeron varios pasos de elución de la proteína con la posterior unificación y liofilización de este material. Sin embargo, el rendimiento obtenido del proceso de purificación en este estudio ha sido el más bajo reportado respecto a los trabajos de Young *et al.*, (1986), Devi *et al.*, (2002) con un rendimiento del 3% y Espitia *et al.*, (1989) con un rendimiento del 1%. Este bajo rendimiento se debe a que no se realizaron procesos de prepurificación de la muestra de CFP para excluir proteínas de alto y bajo peso molecular, por lo cual la muestra estaba muy cruda y concentrada al inicio de la cromatografía, afectando negativamente el cálculo de rendimiento.

Con respecto a la optimización del protocolo de inmovilización se propusieron dos variantes importantes al trabajo de March *et al.*, (2009), con el fin de ajustar las condiciones para la funcionalización de transductores piezoeléctricos empleando antígenos de secreción CFP. La optimización del proceso fue evaluada mediante caracterización topográfica con AFM, donde se encontró cualitativamente, que podía ser empleada una menor cantidad de proteína para la inmovilización, 3,4 veces menos, cuando se empleó un alcanotiol de cadena carbonada larga, para la formación de la primera monocapa en contacto con el oro. Esto representa un ahorro importante de antígeno para ser inmovilizado empleando SAMs en la funcionalización de cristales de 10MHz, además la caracterización topográfica de estas superficies aquí realizada, es un paso de validación importante que no fue tenido en cuenta en el trabajo de March *et al.*, (2009) y otros autores (Ocampo *et al.*, 2011), al momento de fijar la cantidad de proteína a inmovilizar, considerando importante únicamente, encontrar una intensidad de señal considerable con el inmunosensor, a expensas de un mayor gasto del inmunoreactivo en el proceso de inmovilización.

En este estudio no fue posible demostrar, mediante caracterización topográfica, características superficiales deseables en los transductores piezoeléctricos funcionalizados con las muestras purificadas de antígenos enriquecidas en Ag38kDa, siendo necesario un análisis cuantitativo para validar las condiciones de inmovilización

empleadas, tal y como lo realizaron en su trabajo March *et al.*, (2009), en el que se realizaron pruebas de señal máxima con el inmunosensor piezoeléctrico empleando un anticuerpo específico contra el conjugado inmovilizado, con lo cual pudieron verificar si la cantidad de conjugado inmovilizado era adecuada o no en términos de la intensidad de señal obtenida con la QCM. Implementado estas pruebas se podría concluir sobre la posibilidad de emplear las concentraciones de muestras enriquecidas en el Ag38kDa obtenidas en esta investigación, para la funcionalización de cristales piezoeléctricos mediante el protocolo de SAMs optimizado, significando una disminución considerable de la cantidad de antígeno proteico requerido para la inmovilización respecto al protocolo original.

CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación constituyen un aporte importante para el desarrollo de inmunosensores piezoeléctricos para la detección de patógenos infecciosos.

Se desarrolló un protocolo para la purificación de un antígeno nativo de secreción de *Mtb*, el cual, inmovilizado sobre la superficie del electrodo de oro de un transductor piezoeléctrico empleando SAM, podría ser usado para la detección de antígenos nativos de *Mtb* por medio de un inmunosensor piezoeléctrico. Con los métodos desarrollados en este estudio se obtuvieron dos muestras de antígenos de secreción enriquecida en Ag38kDa y se identificaron las variables críticas para aumentar el rendimiento de la cromatografía de afinidad, como una mayor concentración del anticuerpo específico acoplado con las perlas del gel y la prepurificación de las muestras de CFP para retirar proteínas de alto peso molecular.

Adicionalmente, con los ajustes realizados al protocolo de inmovilización empleando muestras de antígenos de secreción totales CFP y mediante estudios topográficos cualitativos con AFM, se logró demostrar que, con una tercera parte de la concentración requerida en el protocolo de referencia y el uso de un alcanotiol de cadena carbonada larga, se podían obtener cristales piezoeléctricos biofuncionalizados con monocapas de antígenos de secreción de *Mtb*, que presentaron características topográficas deseables como forma, homogeneidad, orientación y densidad, para ser empleadas como interfaz biológica en un inmunoensayo de detección con un inmunosensor piezoeléctrico.

Otro hallazgo importante está relacionado con el hecho de que las proteínas de secreción filtradas de cultivo CFP, pueden ser empleadas por sí mismas para la funcionalización de transductores piezoeléctricos, vislumbrando la posibilidad de su uso en la interfaz sólida de estos transductores en el desarrollo de un inmunosensor para el diagnóstico de TB, cuando la sensibilidad del ensayo para la detección de antígenos en forma competitiva se vea comprometida.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Escuela de Ingeniería de Antioquia EIA, Universidad CES, Colciencias proyecto 133352128657, Tecnoparque el Sena nodo Medellín y la Corporación para Investigaciones Biológicas CIB – Medellín-Colombia por apoyar esta investigación y al Instituto Interuniversitario de Investigación en Bioingeniería y Tecnología Orientada al ser Humano (I3BH), Universidad Politécnica de Valencia, Valencia-España, por permitir la estancia científica y el desarrollo de los inmunoensayos ELISA.

REFERENCIAS

- Attallah A, Abdel M, Ismail H, El-saggan A, Omran M, Tabll A. Rapid and simple detection of a Mycobacterium tuberculosis circulating antigen in serum using dot-ELISA for field diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Immunoassay Immunochem.* 2003;24(1):73-87. Doi:10.1081/IAS-120018470
- Bala L, Anand S, Sinha S. Enhancement of human T cell response to a peptide epitope of 38 kDa antigen of Mycobacterium tuberculosis by liposomes. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2002;24(2):255-263. Doi:10.1081/IPH-120003757
- Baldrich E, Laczka O, Campo F, Muñoz F. Gold immunofunctionalisation via self-assembled monolayers: Study of critical parameters and comparative performance for protein and bacteria detection. *J Immunol Methods.* 2008;336:1-10. Doi:10.1016/j.jim.2008.04.017
- Bizet K, Gabrielli C, Perrot H. La microbalance à quartz électrochimique: perspectives d'application en biologie médicale. *Immunoanal Biol Spéc.* 1995;10:205-211.
- Cardoso S, Martin A, Mejía G, Palomino J, Robledo J, Telle M, *et al.* Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. 3ed. Belgium: Vanden Broele; 2004. p. 113-125.
- Coligan J, Kruisbeek A, Margulies D, Shevach E. *Current Protocols in Immunology.* 2 ed. Nueva York. Editorial John Wiley and Sons Inc.; 1995. p. 490-555.
- Devi K, Kumar K, Ramalingam B, Alamelu R. Purification and characterization of three immunodominant proteins (38, 30, and 16 kDa) of Mycobacterium tuberculosis. *Protein Expr Purif.* 2002;24(2):188-95. Doi:10.1006/prep.2001.1569
- Espitia C, Cervera I, González R, Mancilla R. A 38-kD Mycobacterium tuberculosis antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation. *Clin Exp Immunol.* 1989;77(3):373-377.
- Fengjiao H, Zhang L. Rapid Diagnosis of M.tuberculosis Using a Piezoelectric Immunosensor. *Anal Sci.* 2002;18:397-403.
- Gennaro M. Immunologic Diagnosis of Tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2000;30(3): 243-246. Doi: 10.1086/313868
- Jaramillo M, Montagut Y, Montoya A, Robledo J, Marín P, Betancur J, *et al.* Design of a piezoelectric immunosensor

- for tuberculosis biomarker detection. In Health Care Exchanges (PAHCE). 2013;1-7. Doi:10.1109/PAHCE.2013.6568332
- Luppa P, Sokoll L, Chan D. Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. *Clin Chim Acta*. 2001;314:1–26. Doi: 10.1016/S0009-8981(01)00629-5
- Manlús J, Montoya A. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for 3,5,6-trichloro-2-pyridinol. 1. Production and characterization of monoclonal antibodies. *J Agric Food Chem*. 1996;44(11):3703–3709. Doi:10.1021/jf950656p
- March C, Manlús J, Jiménez Y, Arnau A, Montoya A. A piezoelectric immunosensor for the determination of pesticide residues and metabolites in fruit juices. *Talanta*. 2009;78: 827–833. Doi: 10.1016/j.talanta.2008.12.058
- McNerney R, Maeurer M, Abubakar I, Marais B, D.Mchugh T, Ford N, *et al.* Tuberculosis Diagnostics and Biomarkers: Needs, Challenges, Recent Advances, and Opportunities. *J Infect Dis Ther*. 2012;205(2):47–58. Doi: 10.1093/infdis/jir860
- Montoya A, Ocampo A, March C. Fundamentals of Piezoelectric Immunosensors. In: *Piezoelectric Transducers and Applications*. 2ed. Berlin: Springer Heidelberg.; 2008. p.289-307. Doi: 10.1007/978-3-540-77508-9
- Nagel T, Ehrentreich E, Singh M, Brandenburg A, Berka A, Bier F. Direct detection of tuberculosis infection in blood serum using three optical label-free approaches. *Sens Actuators B Chem*. 2008;129:934–940. Doi:10.1016/j.snb.2007.10.009
- Nowinski R, Lostrom M, Tam M, Stone M, Burnette W. The Isolation of Hybrid Cell Lines Producing Monoclonal Antibodies Against the p15(E) Protein of Ecotropic Murine Leukemia Viruses. *Virology*. 1979;93:111–112. Doi: 10.1016/0042-6822(79)90280-0
- Ocampo A, Jaramillo M, March C, Montoya A. Inmunosensor piezoeléctrico para la detección del metabolito 3,5,6-tricloro-2-piridinol del plaguicida clorpirifos. *Rev Ing Biomed*. 2011;16:127–136.
- Owen T, Al-kaysi R, Bardeen C, Cheng Q. Microgravimetric immunosensor for direct detection of aerosolized influenza A virus particles. *Sens Actuators B Chem*. 2007;126(2):691–699. Doi:10.1016/j.snb.2007.04.028
- Parish T, Stoker N. *Mycobacterium Tuberculosis Protocols*. 3ed. In: *Vitro Humana Pre*. Nueva York; 2001. p. 205:215.
- Poderys V, Matulionyte M, Selskis A, Rotomskis R. Interaction of Water-Soluble CdTe Quantum Dots with Bovine Serum Albumin. *Nanoscale Res Lett*. 2011;6(1):9–14. Doi:10.1007/s11671-010-9740-9
- Steingart K, Dendukuri N, Henry M, Schiller I, Nahid P, Hopewell P, *et al.* Performance of purified antigens for serodiagnosis of pulmonary tuberculosis: a meta-analysis. *Clin Vaccine Immunol*. 2009;16(2):260–76. Doi:10.1128/CVI.00355-08
- Walzl G, Ronacher K, Djoba Siawaya J, & Dockrell H. Biomarkers for TB treatment response: challenges and future strategies. *J Infect*. 2008;57(2):103–109. Doi:10.1016/j.jinf.2008.06.007
- Wang L, Ran Q, Tian Y, Xu J, Xian Y, Peng R, Jin L. Covalent immobilization of redox protein via click chemistry and carbodiimide reaction: Direct electron transfer and biocatalysis. *J Colloid Interface Sci*. 2010;350:544–550. Doi:10.1016/j.jcis.2010.07.018
- World Health Organization (WHO). Estadísticas Sanitarias Mundiales:2013. 2013 p. 172. From http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/82218/1/9789243564586_spa.pdf?ua=1
- Young D, Kent L, Rees A, Lamb J, Ivanyi J. Immunological activity of a 38-kilodalton protein purified from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1986;54(1):177–83.
- Zenteno R. Pasado, presente y futuro de las técnicas diagnósticas de tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 2003;16:181–186.