

Artículo de revisión

Relevancia del uso de nanomateriales utilizados en biosensores para la detección de Tuberculosis

Oviedo-Chávez D. (1), López-Romero W. (2), Flores-Valdez M.A.(2)

(1) Departamento de Matemáticas y Física, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente, San Pedro Tlaquepaque, (2) Biotecnología Médica y Farmacéutica, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C., Guadalajara, México.

Resumen

Antecedentes: Un diagnóstico específico y sensible es un punto primordial para el control de la tuberculosis (TB), una enfermedad infecto-contagiosa con potencial mortal para los seres humanos. Las tecnologías de biodetección en conjunto con la nanotecnología presentan un enorme potencial para mejorar la detección de TB y el manejo general del diagnóstico clínico. Se ha desarrollado una amplia gama de nanobiosensores portátiles, sensibles, específicos y rápidos basados en diferentes principios de transducción de señal y con diferentes capacidades de identificación de biomarcadores para la detección de TB en las primeras etapas. **Objetivo:** Presentar una revisión concisa de las técnicas de detección de TB convencionales y de las tecnologías de biosensores y nanobiosensores. **Materiales y métodos:** Búsqueda bibliográfica en Pubmed con las palabras claves “tuberculosis” y “diagnosis” con especial atención en publicaciones que incorporan nanotecnología. **Resultados:** De acuerdo a la bibliografía consultada, los nanobiosensores producen los resultados que se persiguen y cumplen las características establecidas en el objetivo de un diagnóstico certero de TB y no solo por memoria inmunológica. **Conclusiones:** La combinación de biosensores con plataforma nanotecnológica han permitido desarrollar técnicas de diagnóstico que ofrecen una gama de propuestas para catalogar como dispositivos para punto de atención [point-of-care (POC)] y ser empleadas en zonas marginadas y altamente afectadas por TB.

Palabras Clave: Diagnóstico, tuberculosis, biosensores y nanobiosensores.

Abstract

Background: A specific and sensitive diagnosis is a fundamental objective for the control of tuberculosis (TB), a life-threatening infectious disease in humans. Technologies employed for biodetection in conjunction with nanotechnology have enormous potential to drive TB detection and general management of clinical diagnosis. A wide range of rapid, sensitive, specific, and rapid portable nanobiosensors have been developed based on different signal transduction principles and with different biomarker detection capabilities for early stage TB detection. **Objective:** Present a review focused on conventional TB detection techniques and biosensors and nanobiosensors technologies. **Materials and methods:** Bibliographic search in PubMed with the keywords “tuberculosis” and “diagnosis” paying special attention to publications incorporating nanotechnology. **Results:** Nanobiosensors produce the results that are sought and fulfill the characteristics established in the objective of an accurate diagnosis of TB and not and not only based on detection of immunological memory. **Conclusions:** The combination of biosensors with a nanotechnology platform has allowed the development of diagnostic techniques that offer a range of proposals to classify as point-of-care (POC) devices and be used in marginalized areas highly affected by TB.

Keywords: Diagnosis, tuberculosis, biosensors and nanobiosensors.

Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad bacteriana infecto-contagiosa potencialmente grave y es causada por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Es la novena causa

de muerte a nivel mundial y la principal enfermedad transmisible (contagiosa) (Flores *et al.*, 2018). Al grupo de especies relacionadas genéticamente de *Mycobacterium*

que puede causar TB se le conoce como complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC, por sus siglas en inglés) y se compone de ocho especies. Entre otras micobacterias causantes de TB, aparte de MTB, se encuentran *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* y *M. canetti* (Gupta & Kakkar, 2018). La tuberculosis pulmonar (PTB, por sus siglas en inglés) constituye alrededor del 80% del total de los casos. Sin embargo, en algunas ocasiones puede propagarse a otros órganos del cuerpo a través de la circulación sanguínea; referidos estos casos como tuberculosis extrapulmonar (EPTB, por sus siglas en inglés) (Acharya *et al.*, 2020). En algunos casos, llegan a presentarse como osteotuberculosis, neurotuberculosis, TB cutánea, TB genitourinaria, TB ganglionar, entre otros (Mohd Azmi *et al.*, 2018).

Se han identificado dos estados de TB distinguibles clínicamente: activa y latente; en ambos casos, la bacteria está presente en el cuerpo humano. En la TB activa, la bacteria se multiplica constantemente e invade diversos órganos con un alto potencial infeccioso. Por otro lado, la TB latente es asintomática, es decir, la bacteria no tiene la capacidad de infectar a otros (Ramírez-Priego *et al.*, 2018). Prácticamente el 10% de los casos de TB latente se llegan a tornar en TB activa; que si no se detectan ni se llegan a tratar a tiempo, existe mayor probabilidad que sea mortal para el individuo (Mohd Azmi *et al.*, 2018).

La susceptibilidad del huésped a la tuberculosis principalmente está condicionada por afecciones que debilitan al sistema inmune, también considerando la edad y el sexo de la persona. Quienes tienen enfermedades como VIH/SIDA, diabetes mellitus y cáncer están inmunocomprometidos y tienen alto riesgo para enfermarse de TB. También las personas que abusan de sustancias nocivas, que viven desnutridas, se les ha realizado un trasplante de órgano o están en tratamientos de corticoides y de artritis reumatoide (CDC, 2016). En lo que respecta a la edad, se ha identificado que los niños menores de 5 años y los adultos mayores de 65 años en adelante son más susceptibles. Así mismo, los hombres son ligeramente más propensos que las mujeres, no obstante, se cree que este factor está influenciado por los hábitos sociales (Alcaide *et al.*, 2000).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó, en el 2018, que a nivel global hubo 7,253,116 casos nuevos de TB confirmados; observándose un incremento del 3.4% en comparación al año anterior. La mayor incidencia en hombres se observó en las edades de 25-34 años, siendo el mismo caso para las mujeres; donde el 58%

de los casos se presentó en hombres, 34% fueron casos de mujeres y 8% niños (0-14 años) (WHO, 2019). En lo que respecta en México, en el mismo año, se notificó un total de 24,096 casos, donde cerca de 2,800 casos se presentaron en personas con VIH/Sida y 23,271 fueron casos nuevos junto con recaídas; siendo 61% de los casos hombres, 36% mujeres y 3% niños (0-14 años) (WHO, 2020). Se detectaron alrededor de 15 mil casos nuevos de PTB dentro de los cuales 2 mil terminaron en defunción (Flores *et al.*, 2018). Dentro del Boletín Epidemiológico más reciente de la semana 15 del 2020, en el estado de Jalisco se tenían registrados un total de 314 casos de TB; 182 hombres y 128 mujeres diagnosticados con PTB y cuatro mujeres con EPTB (Secretaría de Salud & Dirección General de Epidemiología, 2020).

Un diagnóstico específico y confiable de TB permitirá disminuir retrasos tanto en la detección de personas infectadas como en el inicio del tratamiento adecuado. Esto lo convierte en un punto crucial para lograr la disminución de defunciones por esta causa y la reducción de contagios al resto de la población. Cabe destacar que se ha demostrado que el retraso entre la aparición de los síntomas y un adecuado diagnóstico propicia el contagio a los presentes dentro del entorno del infectado (Alcaide *et al.*, 2000). Es importante considerar las distintas condiciones de la infección, los biomarcadores disponibles en cada una y la forma en que es posible pasar de una condición a otra. Siendo puntos importantes para seleccionar la técnica de diagnóstica adecuada con el propósito de obtener un resultado verídico y específico (Petruccioli *et al.*, 2016). En la Tabla I se resumen la presencia-ausencia y aumento-decremento de los biomarcadores básicos en las distintas condiciones de infección, junto a las dos técnicas clínicas básicas que se emplean para determinar dicho estado.

La nanotecnología ha permitido el desarrollo de nuevas plataformas de diagnóstico destinadas a una detección de patógenos con mayor sensibilidad y de forma más rápida. Éstas deberán ser simples, de bajo costo y, principalmente, adecuado para entornos clínicos de bajos recursos y de fácil integración a la práctica clínica (Gordillo-Marroquín *et al.*, 2018). Actualmente en el CIATEJ (Sede Guadalajara) se busca desarrollar un nanobiosensor de alta especificidad, sensible a concentraciones bajas, no invasivo, sencillo y de bajo costo. Su diseño permitirá realizar la prueba de forma rápida; permitiendo entregar los resultados en el momento. Los componentes que se buscan implementar permitirán determinar un costo accesible al igual que su manipulación.

Tabla I.
Resultado de la transmisión de MTB y el establecimiento de una condición respecto a las correlaciones de la enfermedad y del riesgo (Adaptado de Petruccioli *et al.*, 2016).

Condición	Radiografía/ Cultivo MTB	Firma transcriptómica	Activación células T	CD8+ específico	Relación Monocito: Linfocito	Tornarse en...
(1) Sin infección	-/-	-	-	-	↓	P a (2)
(2) Infección primaria o secundaria	-/-	-	-	-	↓	P a (1), P a (3)
(3) Fase clínica activa	+/+	+	+	+	↑	T a (1) y (2), P a (5)
(4) Equilibrio inmunológico (latencia)	-/-	+	+	+	↑	Sin recomendación
(5) Subclínica/ inicial	±/±	+	+	+	↑	P a (3)

Simbología= (+): presencia, (-): ausencia. (↑): aumento, (↓): decremento, (T): transmisión, (P): progresión.

Fuente: Propia.

El objetivo de este trabajo se enfoca en proveer una revisión concisa de las técnicas de detección de TB disponibles en la actualidad, desde los que están en uso hasta los que se encuentran en desarrollo con aplicación nanotecnológica. Presentamos los beneficios de usar diversas técnicas como biosensores con plataforma de nanomateriales sobre las técnicas convencionales; mencionando sus características para denotar cuáles son sus ventajas y cuáles sus limitantes. Exponemos sus principales características y propiedades reportadas que dan un aporte para lograr un diagnóstico temprano y eficaz.

Técnicas de diagnóstico convencionales para TB

Comenzaremos la revisión con el desglose de las distintas técnicas convencionales empleadas actualmente. Una evaluación inicial para el diagnóstico de TB, usado en la mayoría de los países de ingresos bajos y medios, es el método de microscopía de esputo (SSM, por sus siglas en inglés) junto con la tinción de Ziehl-Neelsen (Z-N). La técnica se basa en analizar un frotis de esputo por microscopía de bacilos ácido-alcohol resistentes (AFB, por sus siglas en inglés) con una sensibilidad en el orden de 1000 y 10, 000 AFB/mL. La prueba es relativamente fácil de realizar, de acceso económico, provee resultados rápidos y no requiere equipos complejos. Su sensibilidad se cataloga limitada porque la carga bacteriana presente requiere estar, como ya se mencionó entre 5,000–10,000

AFB/mL (Gupta & Kakkar, 2018). Otra limitante conocida se ubica en la tinción Z-N porque no puede diferenciar MTB de otros AFB (Acharya *et al.*, 2020). Muchos países han confiado en la SSM directa (no concentrada) para la detección de PTB, pero el método ha mostrado un historial pobre en casos de TB extrapulmonar, TB pediátrica y en pacientes con TB y VIH/Sida (Bhusal *et al.*, 2018).

En el 2007, la OMS aprobó un sistema de cultivo (líquido) con el fin de identificar y realizar pruebas de susceptibilidad a los medicamentos (DST, por sus siglas en inglés) contra TB. Este sistema incrementa la señal de fluorescencia por el consumo de oxígeno al multiplicar los bacilos y se manejan dos presentaciones: BACTEC 460 y BACTEC MGIT 960 (Acharya *et al.*, 2020); donde el más utilizado es el MGIT porque permite un monitoreo continuo, no es radiométrico y es fácil de usar (Mohd Azmi *et al.*, 2018). Es tan eficaz como el cultivo convencional de Lowenstein-Jensen (L – J; popular para aislar cepas de MTB obtenidas de seres humanos) tanto para detectar micobacterias como la resistencia a los agentes antimicobacterianos. Sin embargo, se limita a la identificación inicial de micobacterias, además de requerir pruebas adicionales para especular sobre MTB (Acharya *et al.*, 2020). Se ha asociado que, a un largo tiempo de procesamiento en este sistema, mayores son las tasas de contaminación; siendo otra limitante conocida. En cambio, el cultivo líquido

MGIT presenta superioridad en comparación con el cultivo sólido L-J en una población coinfectada por VIH/TB; teniendo mayor rendimiento y no siendo afectado (significativamente) por el recuento de células CD4 con respecto a la positividad del cultivo (Hongler *et al.*, 2018). Para un diagnóstico rápido, se ha empleado la evaluación del nivel de enzima adenosina desaminasa (ADA) y de pruebas de amplificación basadas en ácido nucleico (NAA, por sus siglas en inglés); dichas pruebas son recomendadas por la OMS (Gupta & Kakkar, 2018). A pesar de ello, es crucial contar con un sistema de diagnóstico de alta calidad (especificidad y sensibilidad adecuada) y rápida para la detección de TB. Debido a que estas pruebas presentan especificidad relativamente baja, poseen capacidad de distinción limitada, tardan mucho tiempo para dar un resultado válido y son propensos a errores de rendimiento que pueden conducir a resultados falsos (Perumal *et al.*, 2018).

Para una detección temprana en personas de alto riesgo de contagio, donde se asuma la existencia de TB latente, se emplea principalmente la prueba cutánea de tuberculina (TST, por sus siglas en inglés) o puede optarse por una prueba de sangre (TBT, por sus siglas en inglés) (Gupta & Kakkar, 2018). La TST consiste en la aplicación de una mezcla compleja de proteínas denominada derivado proteico purificado (PPD, por sus siglas en inglés), en el antebrazo de una persona posiblemente infectada. Al final ocurre, o no, una reacción inflamatoria localizada y de tamaño variable, que se evalúa junto con la frecuencia de contacto (si es que existe) con personas infectadas de TB; para determinar si es o no una reacción positiva. Su principal inconveniente se le atribuye a la composición del PPD porque es muy similar a la de la vacuna Bacillus de Calmette-Guerin (BCG) aplicada en niños y por otras micobacterias presentes en el medio ambiente que no causan TB (Flores, 2017).

Una técnica de biología molecular muy utilizada es la prueba de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, por sus siglas en inglés), es un método NAA simple, rápido, específico y rentable. Se utilizan diferentes conjuntos de cebadores (al menos 4) y se reconocen regiones distintas (al menos 6); sintetiza grandes cantidades de ADN sin el requisito previo de ciclos térmicos (Acharya *et al.*, 2020). La amplificación ocurre en un solo paso mediante una reacción de desplazamiento de cadena durante 15-60 min a temperatura constante de aproximadamente 65°C. Los resultados se interpretan simplemente visualizando los patrones de fluorescencia (basándose en los controles negativos y positivos) (Gupta-Wright & Lawn, 2015). Posee una eficiencia extremadamente alta, una amplia detección mediante

inspección visual de la fluorescencia incorporada, su sensibilidad y especificidad general agrupadas se ubican dentro del rango de 76-80% y 97-98% respectivamente. Además, no requiere de reactivos especiales ni de equipos sofisticados (Acharya *et al.*, 2020). Su limitación principal se ubica en que no es capaz de identificar las mutaciones que confieren resistencia a antibióticos (Gupta-Wright & Lawn, 2015).

Desde 2010, la OMS recomienda la prueba rápida de reacción en cadena de la polimerasa y de resistencia a rifampicina (GeneXpert MTB/RIF). Es una plataforma de PCR en tiempo real para diagnosticar e identificar la resistencia a la rifampicina con una duración de 2 h. Su uso es limitado debido a su alto costo (instrumentos, cartuchos y competencias en laboratorio) y puede llegar a proporcionar resultados falsos positivos (Gordillo-Marroquín *et al.*, 2018). La rifampicina es el antibiótico más comúnmente empleado para tratar TB, junto con otras enfermedades; por ello es necesario conocer si el paciente es resistente a ella (Ramírez-Priego *et al.*, 2018). A pesar de ello, llega a ser más sensible y/o específico que el SSM (Bhusal *et al.*, 2018), pero se reitera que es de costo elevado y no de fácil acceso.

La dificultad que enfrentan los esfuerzos de atención y prevención de la TB se llega a entender por los inconvenientes identificados respecto a las técnicas convencionales (Bhusal *et al.*, 2018). Es necesaria una plataforma que sea rentable, fácil de usar, de diagnóstico rápido, no invasiva y que requiera estándares mínimos de bioseguridad. La falta de detección en tiempo real y los requisitos de costosos laboratorios centralizados y personal técnico calificado son las principales limitaciones de estos métodos. Esto vuelve esencial desarrollar técnicas en tiempo real, portátiles, sensibles y de alta especificidad que puedan detectar MTB de manera rápida a un costo asequible (Gupta & Kakkar, 2018). El diagnóstico rápido, preciso y específico de TB es uno de los pasos más importantes para instituir medidas de control epidemiológicas; desafortunadamente, éste todavía es deficiente y se mantiene en curso alcanzar dicha meta.

Biosensores para la detección de TB

Las pruebas de diagnóstico mejoradas tienen la finalidad de aplicarse en comunidades marginadas, de escasos recursos y que presenten deficiencias en sus sistemas de salud. Estas pruebas deben cumplir ciertas características técnicas para su empleo; ser específicas, sensibles, precisas que ofrezcan resultados en periodos cortos de tiempo (Bhusal *et al.*, 2018) para verificar que se ha adquirido una infección por algún integrante del MTBC, y de ser necesario, prevenir el desarrollo de TB en etapas tempranas de la infección.

Una alternativa a los métodos de diagnóstico convencionales son los biosensores, ya que poseen una mejora en la sensibilidad y especificidad por medio de la detección de biomarcadores en matrices de muestras bastante complejas como la orina, el suero, la saliva, la sangre, entre otras (Bai *et al.*, 2019). Estos dispositivos compactos cuentan con un componente de reconocimiento biológico y un transductor fisicoquímico (bio-transductor) (Gordillo-Marroquín *et al.*, 2018). El elemento de reconocimiento biológico puede ser una enzima, un antígeno (Ag), un anticuerpo, un ácido nucleico, el mismo microorganismo y/o sus subproductos. Son empleados diferentes procesos de inmovilización química o física para unir firmemente dicho elemento al bio-transductor para la posterior medición de señales (Gupta & Kakkar, 2018).

De acuerdo con el transductor empleado, los biosensores pueden ser electroquímicos, ópticos, basados en masa o magnéticos y específicamente para el diagnóstico de TB, se clasifican de acuerdo con el analito empleado en la detección sea esputo, sangre u orina (Gupta & Kakkar, 2018). En consecuencia, se han ideado y desarrollado, a nivel laboratorio, prospectos de pruebas que tomen el lugar de las técnicas convencionales. La elección de los prospectos se toma con base en las propiedades que posea el biosensor, comparándolas con las ineficiencias que presentan las técnicas convencionales así como su costo y producción. En la Tabla II se describen algunos biosensores desarrollados hasta el momento junto al principio en el que se basan. También discutimos algunas de las ventajas y desventajas de estos sistemas reportados.

Tabla II.
Biosensores desarrollados para la detección de TB.

Sensor	Principio-Características
Sensores basados en microbalanzas de cristal de cuarzo (QCM, por sus siglas en inglés); revisado por Gupta & Kakkar.	<ul style="list-style-type: none"> - Se recubre el QCM mediante un copolímero de estireno-butadieno-estireno (imita a una membrana celular). - Se inmovilizan los anticuerpos contra MTB en dicha capa. - Monitoreo en tiempo real de MTB capturado a través del cambio en la frecuencia por el cambio en la relación masa/carga. - Es simple, rápido y de sensibilidad de 100,000 células/mL. - Limitaciones: conductividad eléctrica, viscosidad, constante dieléctrica y densidad de la muestra.
Tecnología de cristal piezoeléctrico en serie; revisado por Gupta & Kakkar.	<ul style="list-style-type: none"> - Se emplean cristales de cuarzo en serie multicanal (MSPQC, por sus siglas en inglés). - Se extraen productos volátiles (NH₃, CO₂) debido al crecimiento de células MTB del esputo analizado. - Límite de detección: 10 UFC/mL. - Menos costoso y más sensible - Limitaciones: requiere 2-3 días y un pretratamiento para la muestra.
Biosensor magnetoelástico; revisado por Gupta & Kakkar.	<ul style="list-style-type: none"> - Estructura independiente compuesta de película magnetoelástica; en forma de cinta con una capa de detección bioquímica/química (enzima). - Límite de detección: 10,000 células/mL. - Presenta identificación directa y en tiempo real de la MTB de muestras de esputo.
Sistema electrónico de detección de nariz; revisado por Gupta & Kakkar.	<ul style="list-style-type: none"> - Sistema de detección de gas basado en polímeros electroconductores. - Logra diferenciar entre cultivos líquidos no infectados de infectados con MTBC. - Se identifican diferentes especies de micobacterias in vitro.



Sensor	Principio-Características
Sensores ópticos con resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés); revisado por Mohd <i>et al.</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Detectan las oscilaciones coherentes de electrones en la interfaz entre los materiales del sensor. - Sensibilidad de 30 ng/μL. - Detecta en MTBC y esputo.
Diagnóstico por resonancia magnética (DMR, por sus siglas en inglés); revisado por Gordillo-Marroquín <i>et al.</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Identifica y detecta MTB y subproductos de esputo sin procesar. - Duración: 30 min. - Límite de detección: 20 UFC/mL. - Monitorea las moléculas de agua circundantes para detectar variaciones en el tiempo de relajación del giro. - Es una adaptación de Lab-on-chip de alto rendimiento, miniaturizada y automatizada de la resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés).
Ensayos de liberación de interferón gamma (IGRAs, por sus siglas en inglés); revisado por Flores.	<ul style="list-style-type: none"> - Usan los antígenos diferentes y que sí presenta la MTB, pero no en la vacuna BCG. - Una muestra de sangre del paciente y se mezcla con dichos antígenos en el laboratorio. - Se mide el interferón gamma (IFN-γ) liberado en respuesta a la estimulación <i>ex vivo</i>. - La reacción inflamatoria se produce fuera del cuerpo, lo que reduce las molestias al paciente (comezón e inflamación en antebrazo). - Fácil de realizar y no necesitan equipos complejos.

Fuente: Propia

Los biosensores muestran características notables e innovadoras en comparación de las técnicas convencionales disponibles para el diagnóstico de TB. Sin embargo, se requieren nuevos antígenos o antígenos debidamente validados para explotar tecnologías de alto rendimiento; para desarrollar pruebas económicas, portátiles y proporcionen resultados en tiempo real. Lo primordial sería que tanto su especificidad como sensibilidad sean mayores o iguales al 80% que se ha alcanzado en las demás. Siendo necesaria una validación de biomarcadores dentro de distintas comunidades, con el fin de demostrar una utilidad verídica y fundamentada para el diagnóstico de TB (López-Romero *et al.*, 2019).

El papel de la nanotecnología para el diagnóstico de TB La tecnología de biosensores basada en nanomateriales ha demostrado ser prometedora, debido a que los avances en nanotecnología han permitido desarrollar nanobiosensores que son rápidos, precisos, versátiles, específicos y altamente sensibles. Una gran variedad de nanomateriales se han fabricado en los últimos años y, a su vez, se han explorado sus aplicaciones en biosensores. La detección de una señal biofísica o bioquímica asociada con una enfermedad particular a nivel de una sola molécula o célula es el objetivo final de los nanobiosensores. La sensibilidad de

estos biosensores se ha mejorado, se ha incrementado la especificidad y los límites de detección se han reducido a través del uso de nanopartículas (NPs) de oro, plata, grafeno o nanoperlas (Gupta & Kakkar, 2018).

Igualmente, varios antígenos secretados por MTB se han estudiado y han sido empleados como biomarcadores para la detección directa de TB, por ejemplo, el lipoarabinomano (LAM), el complejo del antígeno 85 (Ag85), ESAT-6, CFP10, MPT64 y el antígeno de 38 kDa (revisado por Ramírez-Priego *et al.*). Por otro lado, las muestras que se han empleado para analizar son el esputo, la orina y el plasma; se ha optado por usar más la orina porque se obtiene fácilmente, no requiere almacenaje especial, presenta bajo riesgo de infección al usuario y no requiere un alto nivel de bioseguridad (Ramírez-Priego *et al.*, 2018). También está el IS6110, un elemento de inserción único de MTB y difiere en los recuentos repetidos en cada cepa del MTBC, éste se destaca como una herramienta en epidemiología molecular (Bai *et al.*, 2019). El progreso y uso de biomarcadores específicos de MTB permite adquirir mayor especificidad en los nanobiosensores para una detección confiable de TB porque reduce relativamente hasta cero la probabilidad de que se obtengan tanto falsos positivos como falsos negativos.

Antes de exponer a profundidad distintos nanobiosensores que se han desarrollado en la actualidad, se muestra una tabla similar a la de la sección anterior; la Tabla III tiene como fin el comparar rápidamente las características que se ofrecen al implementar nanomateriales en técnicas biotecnológicas. Denotamos diferentes opciones y prospectos que se acercan más a cumplir con el objetivo que se persigue para una detección confiable y específica de TB.

Tabla III.
Nanobiosensores para la detección de TB.

Sensor	Características
ELISA modificada en formación sándwich basada en fluorimetría (Kim et al., 2017)	<ul style="list-style-type: none"> - Transferencia de energía de resonancia fluorescente por interacción dipolo inducido/dipolo inducido. - Se integraron nanohilos de oro (AuNRs, por sus siglas en inglés) y puntos cuánticos recubiertos de silicio (SiQDs, por sus siglas en inglés). - Se identificó Ag85. - Anclaje directo de sus respectivos Ac a los AuNRs y SiQDs. - Detección mínima: 0.013 ng/mL. - Tiempo: 1 h. - Muestra: orina de pacientes.
Nanocompósito de nanotubos de carbono (CNT, por sus siglas en inglés) con zirconia (ZrO2) depositado sobre óxido de estaño-indio (ITO, por sus siglas en inglés) (Das et al., 2011)	<ul style="list-style-type: none"> - Los grupos que contienen oxígeno se usan para inmovilizar el ADN; facilitando una unión fuerte sin ningún agente reticulante. - Analiza sonda de ADN monocatenario (ADNss, por sus siglas en inglés) específica de MTB. - Detección mínima: 0.01 nM. - Tiempo: alrededor de 30 min.
Película delgada de plata (Ag) con fullereno (C60) flexible (FLAG-C60) (Mulpur et al., 2015)	<ul style="list-style-type: none"> - Emplea la emisión acoplada al plasmón superficial (SPCE, por sus siglas en inglés); emisión direccional de fluoróforos. - Emplea una tinción ácido-rápida y un láser como fuente de excitación. - Utiliza una plataforma para teléfonos inteligentes; comparación de fotografías estándar. - Detección mínima: 20 MTB/mm². - Muestra: semen de pacientes.
CNT multiemparejados (MWCNTs, por sus siglas en inglés) esmaltados con polipirrol (PPy, por sus siglas en inglés) y dendrímeros redox de poliamidoamina (PAMAM) (Miodek et al., 2015)	<ul style="list-style-type: none"> - El anclaje del ADN con la superficie se debe a marcadores redox (grupos de ferrocenilo). - Se comparó con resultados de PCR; validando su especificidad y selectividad para MTB. - Detecta la secuencia de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés); gen que determina resistencia a la rifampicina. - Reproducibilidad alta (desviación estándar de 3.3%). - Detección mínima: 0.3 fM

Fuente: Propia



Se ha reportado un nanobiosensor electroquímico donde la modificación del electrodo con nanomateriales proporcionó una mejora en el rendimiento analítico. Fue posible porque el grafeno (GP, por sus siglas en inglés) implementado presenta una gran superficie, alta conductividad eléctrica y biocompatibilidad y por la polianilina (PANI) debido a que proporciona una dinámica electrónica rápida y una excelente actividad electroquímica. Su conjunción tipo PANI/GP puede prevenir defectos en el sustrato de GP y preserva sus características eléctricas (Chan *et al.*, 2016). Para ello, se diseñó un electrodo de oro impreso serigrafiado basado en inmunoensayo (SPGE, por sus siglas en inglés) para la detección de TB, que emplea la proteína CFP10 (Koo *et al.*, 2005) como biomarcador. Se usó un electrodo modificado con PANI/GP y el formato de inmunoensayo en sándwich (Wei *et al.*, 2010) para amplificar la señal de detección, así como para aumentar su selectividad. El formato del inmunoensayo consistió en inmovilizar los anticuerpos (Ac) anti-CFP10 de captura en el SPGE modificado por PANI/GP para capturar CFP10 en la muestra. También, nanopartículas magnéticas de óxido de hierro-oro (Fe₃O₄-Au MNPs, por sus siglas en inglés) se conjugaron con dichos Ac para funcionar como sonda de señal, lo que permitió la detección sensible y cuantitativa de CFP10 en esputo. Éste demostró una excelente reproducibilidad para la detección del Ag CFP10 a baja concentración, fue capaz de detectar dentro de 3 h con linealidad en el rango de 20-100 ng/mL y su límite de detección estimado fue de 15 ng/mL (Mohd Azmi *et al.*, 2018).

Por otro lado, el fullereno (C₆₀) posee una actividad redox inherente sobresaliente, gran potencial para el desarrollo de nanobiosensores altamente sensibles y con amplificación de señal efectiva (Zhou *et al.*, 2018). La modificación de C₆₀ con nanoesferas de GP dopadas con nitrógeno (NGPs) presenta un gran potencial de aplicación tanto por su propiedad electrocatalítica como la densidad electrónica debido a la presencia del N. Además, proporcionan abundantes sitios de anclaje para NPs metálicas que mejoran su rendimiento analítico (Li *et al.*, 2017). Las sondas nanohíbridas NGS/AuNPs con ADN inmovilizado resultan en una sensibilidad mejorada para el análisis de genes y el diagnóstico de enfermedades relacionadas; siendo un ensayo electroquímico del tipo sandwich para la detección de fragmentos IS6110 con sistema biotina-avidina (Chen *et al.*, 2019). Las NGS con C₆₀ presentaron una superficie de alta relación, una gran conductividad y una excelente actividad redox; permitiendo la inmovilización de abundantes nanopartículas de oro en la superficie para etiquetar con abundantes sondas de señal por enlaces Au-S para

propiciar una transferencia de electrones mejorada (Chen *et al.*, 2016). El nanobiosensor se trató con bromuro de tetraoctilamonio (TOAB, por sus siglas en inglés) para inducir electroactividad inherente de la etiqueta del biomarcador; esto resultó en un ensayo sensible y cuantitativo. Las muestras de esputo de pacientes con TB que se emplearon recibieron un tratamiento previo a ser analizadas. Este nanobiosensor mostró una excelente especificidad junto a una excelente reproducibilidad porque la respuesta sucesiva de la señal de voltametría cíclica (CV, por sus siglas en inglés) disminuyó 2.1% después de 30 ciclos de exploración; siendo prometedor en la identificación clínica de TB. Después de 21 días, resguardado a 4°C, las mediciones se mantuvieron 88.6% cercanas respecto a la lectura inicial; indicando una estabilidad a largo plazo aceptable (Bai *et al.*, 2019). El sistema biotina-avidina (Chen *et al.*, 2019) empleado en la construcción del nanobiosensor condujo a una mayor inmovilización de sondas de captura y mejora en el reconocimiento del analito objetivo y, por lo tanto, mejoró la sensibilidad de detección (Bai *et al.*, 2019).

El chip-sensor fotónico basado en un transductor de interferómetro Mach-Zehnder (MZI, por sus siglas en inglés) es altamente sensible y está combinado con un filtro espectral. Este se integra de un cartucho microfluídico de polímero desechable (González-Guerrero *et al.*, 2016) y utiliza un diodo superluminiscente (SLED, por sus siglas en inglés) como fuente de luz. Además, maneja un sensor CMOS para la lectura de la señal, posee una unidad de bombeo y una interfaz gráfica para un monitoreo en tiempo real, procesamiento de datos y control de la administración del fluido en el cartucho del nanobiosensor. La superficie del nanobiosensor se funcionaliza (por adsorción física) con Ac monoclonales selectivos de alta calidad contra LAM (sin etiqueta) (Mukundan *et al.*, 2012). La detección de TB se logró en muestras de orina sin tratamiento previo, donde el límite de detección fue de 475 pg/mL (27.14 pM); corroborando la excelente selectividad y sensibilidad de los Ac producidos. La validación de la metodología con muestras clínicas de pacientes con TB y muestras de donantes sanos permitió la detección de TB en personas con y sin coinfección por VIH, los resultados mostraron una excelente correlación con GeneXpert y SSM; demostrando una alta sensibilidad (100%) y especificidad (100%) en comparación con esas técnicas. Sus ventajas son su bajo costo, uso único, facilidad de uso, resultados en 15 minutos, sin necesidad de personal calificado para la operación ni de infraestructura especial. No obstante, existen interferencias para detectar TB en personas sin VIH, pero aún es considerable para ser seleccionado

como dispositivo point-of-care (POC) (Ramírez-Priego *et al.*, 2018).

Las técnicas bottom-up como el autoensamblaje de materiales mediante deposición química de vapor (CVD, por sus siglas en inglés) han permitido el desarrollo de grafeno tridimensional (GP-3D, por sus siglas en inglés) microporoso (Chen *et al.*, 2011). Por otro lado, las nanoestructuras de Au son biocompatibles y capaces de detectar ADN debido a su capacidad para mejorar la unión biomolecular y proporcionar un anclaje para ADN tiolado/sulfidrilo (Al-Ani *et al.*, 2017). La formación novedosa de nanovarillas de Au (AuNRs, por “nanorods” en inglés) mediante pulverización continua en la superficie de GP-3D, permitió desarrollar una plataforma de detección altamente sensible, selectiva y flexible. La caracterización mostró una estructura única irregularmente espaciada con superficies onduladas (70-100 μm) que hacen que las AuNRs se autoensamben para formar un islote y finalmente una estructura en forma de barra en el GP-3D que aumenta el grosor conforme incrementa la pulverización de Au. El nanocompuesto GP-3D/AuNRs proporcionó áreas de alta superficie y especificidad (SSA, por sus siglas en inglés), transporte rápido de electrones, una fuerte resistencia mecánica y alta actividad catalítica debido a la combinación de estructuras porosas 3D y las excelentes propiedades intrínsecas del Au. De igual manera, concedió una ruta eficiente para la quimioadsorción del ADN de la sonda tiolada durante la inmovilización y la hibridación de ADN objetivo. El nanobiosensor alcanzó satisfactoriamente un nivel de sensibilidad de 10 fM con excelente especificidad; gran detección de ADN objetivo y excelente especificidad de secuencia. Esta estrategia puede limitarse por la textura ondulada en el GP-3D disponible y posiblemente de las películas finas metálicas que se lleguen a depositar (Perumal *et al.*, 2018).

El ensayo de biosensores colorimétricos (NCBA, por sus siglas en inglés) basado en MNPs funcionalizadas con glucano permite capturar y aumentar el recuento de bacilos ácido-alcohol resistentes (AFB, por sus siglas en inglés), especialmente en muestras de esputo, sin el uso de Ac caros y sensibles a la temperatura para diagnosticar PTB (Akbarzadeh *et al.*, 2012). Las MNPs funcionalizadas con glucano (GMNPs) son extractoras y concentradoras de AFB porque facilitan la detección rápida. Los bacilos teñidos de rojo agrupados se rodean de las GMNPs marrones, esto se debe a la tinción ácido-alcohol resistente de las micobacterias (Kik *et al.*, 2014). La tolerancia al ácido es una propiedad de tinción específica de estas especies porque poseen en su

superficie de la pared celular la presencia de complejos hidroxilípidos de cadena ramificada (ácidos micólicos). En dicha tinción, el grupo ácido carboxílico del ácido micólico reacciona con el colorante fucsina. El uso de un biorreceptor de glucano en GMNPs permite la captura simple y económica de células MTB en muestras de esputo, no requiere almacenamiento en frío y permite su aplicación en condiciones sin refrigeración ni electricidad (Bhusal *et al.*, 2018).

Se determinó en un ensayo que 10 mg/mL era la cantidad óptima para capturar y concentrar AFB, resultando en el mayor conteo de AFB por campo (Gordillo-Marroquín *et al.*, 2018). En otro se logró detectar una concentración muy baja de AFB a 100 UFC/mL (Bhusal *et al.*, 2018). Además, cuanto más larga sea la separación magnética, mayor será la exposición de AFB a la solución de homogeneización de NaOH/N-acetil-L-cisteína (NALC), lo que reduce la viabilidad del AFB (Gordillo-Marroquín *et al.*, 2018). Por otro lado, cuanto menor es el número de bacterias en la solución, mayor es la proporción de GMNPs para unirse y autoensamblarse en la superficie (epítomos) a través de las lectinas que se unen a los carbohidratos de las bacterias. El tamaño promedio de las GMNPs fue de 99 ± 58 nm, resultaron ser superparamagnéticas y se almacenaron a temperatura ambiente; presentando una estabilidad de 12 meses (Bhusal *et al.*, 2018). Las ventajas del ensayo de GMNPs son que se realiza a temperatura ambiente, no requiere fuente de alimentación ni refrigeración, es accesible (\$0.10 dólares/prueba), se realiza en menos de 20 min y es simple de implementar en clínica (Gordillo-Marroquín *et al.*, 2018). Sin embargo, no se realizaron experimentos de especificidad/reactividad cruzada, por lo que, será necesario complementarlo a futuro para ser propuesto como un dispositivo POC (Bhusal *et al.*, 2018).

Conclusiones

Las técnicas convencionales de diagnóstico de TB, como el cultivo y la microscopía, son demasiado demandantes en tiempo y carecen de una alta especificidad si las comparamos con las nuevas tecnologías. Gracias a los resultados de la colaboración y el uso de una plataforma como la nanotecnología en los biosensores, se han ideado, desarrollado, analizado y puesto a prueba distintos ensayos que presentan las características más acordes al objetivo perseguido. Puesto que tienen el potencial y el conjunto de las características requeridas para impulsar la detección oportuna de TB en el ámbito de diagnóstico clínico. La tecnología de biosensores han sido un gran paso para alcanzar el objetivo establecido porque ha ayudado a desarrollar enormes oportunidades para la



detección rápida y precisa de TB en comparación con las técnicas convencionales utilizadas en entornos de laboratorio. No obstante, la integración exitosa de la nanotecnología con la tecnología de biodetección produce los resultados y las características definidas en el objetivo del desarrollo de dispositivos POC. Además, la portabilidad de estos nanobiosensores los hace ideales para la patogénesis de muchas más enfermedades; lo que permitirá un mejor control de la epidemia de TB en

los países en donde más tienen defunciones anuales y donde es un peligro latente.

Contacto:

Dr. Mario Alberto Flores Valdez

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C., Sede Guadalajara.

(33) 33455200 Ext. 1301

Av. Normalistas 800, Col. Colinas de la Normal. C.P: 44270.

floresv@ciatej.mx & floresvz91@gmail.com

Referencias bibliográficas

- Acharya, B., Acharya, A., Gautam, S., Ghimire, S. P., Mishra, G., Parajuli, N., & Sapkota, B. (2020). Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of Mycobacterium tuberculosis. *Molecular Biology Reports*. doi:10.1007/s11033-020-05413-7
- Akbarzadeh, A., Samiei, M., & Davaran, S. (2012). Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Research Letters*, 7(1), 144. doi:10.1186/1556-276x-7-144
- Alcaide Megías, J., Altet Gómez, M. N., & Canela I Soler, J. (2000). Epidemiología de la tuberculosis. *Anales Españoles de Pediatría*, 53(5), 449–457. [https://doi.org/10.1016/s1695-4033\(00\)78628-0](https://doi.org/10.1016/s1695-4033(00)78628-0)
- Bai, L., Chen, Y., Liu, X., Zhou, J., Cao, J., Hou, L., & Guo, S. (2019). Ultrasensitive electrochemical detection of Mycobacterium tuberculosis IS6110 fragment using gold nanoparticles decorated fullerene nanoparticles/nitrogen-doped graphene nanosheet as signal tags. *Analytica Chimica Acta*. doi:10.1016/j.aca.2019.06.043
- Bhusal, N., Shrestha, S., Pote, N., & Alocilja, E. (2018). Nanoparticle-Based Biosensing of Tuberculosis, an Affordable and Practical Alternative to Current Methods. *Biosensors*, 9(1), 1. doi:10.3390/bios9010001
- CDC. (2016). Factores de riesgo de la tuberculosis | Datos básicos sobre la tuberculosis | TB | CDC. Retrieved April 20, 2020, from <https://www.cdc.gov/tb/esp/topic/basics/risk.htm>
- Chan, K. F., Lim, H. N., Shams, N., Jayabal, S., Pandikumar, A., & Huang, N. M. (2016). Fabrication of graphene/gold-modified screen-printed electrode for detection of carcinoembryonic antigen. *Materials Science and Engineering: C*, 58, 666–674. doi:10.1016/j.msec.2015.09.010
- Chen, M., Hou, C., Huo, D., Bao, J., Fa, H., & Shen, C. (2016). An electrochemical DNA biosensor based on nitrogen-doped graphene/Au nanoparticles for human multidrug resistance gene detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 85, 684–691. doi:10.1016/j.bios.2016.05.051
- Chen, Y., Liu, X., Guo, S., Cao, J., Zhou, J., Zuo, J., & Bai, L. (2019). A sandwich-type electrochemical aptasensor for Mycobacterium tuberculosis MPT64 antigen detection using C60NPs decorated N-CNTs/GO nanocomposite coupled with conductive PEI-functionalized metal-organic framework. *Biomaterials*, 216, 119253. doi:10.1016/j.biomaterials.2019.119253
- Das, M., Dhand, C., Sumana, G., Srivastava, A. K., Vijayan, N., Nagarajan, R., & Malhotra, B. D. (2011). Zirconia grafted carbon nanotubes based biosensor for M. Tuberculosis detection. *Applied Physics Letters*, 99(14), 143702. doi:10.1063/1.3645618
- Flores, M. A., López, W., & Aceves, M. de J. (2018). El diagnóstico oportuno de tuberculosis en personas diabéticas: ¿es posible? | México es ciencia - El Sol de México. Retrieved February 10, 2020, from <https://www.elsoldemexico.com.mx/analisis/el-diagnostico-oportuno-de-tuberculosis-en-personas-diabeticas-es-posible-mexico-es-ciencia-1678964.html>
- Flores, M. A. (2018). Cómo mejorar diagnóstico de tuberculosis - Conacyt - | La Crónica de Hoy. Retrieved February 10, 2020, from <http://www.cronica.com.mx/notas/2018/1071912.html>
- Flores, M. A. (2017). ¿Cómo han evolucionado los métodos para diagnosticar tuberculosis latente? - Conacyt - | La Crónica de Hoy. Retrieved February 10, 2020, from <http://www.cronica.com.mx/notas/2017/1048841.html>
- González-Guerrero, A. B., Maldonado, J., Herranz, S., & Lechuga, L. M. (2016). Trends in photonic lab-on-chip interferometric biosensors for point-of-care diagnostics. *Analytical Methods*, 8(48), 8380–8394. doi:10.1039/c6ay02972h
- Gordillo-Marroquín, C., Gómez-Velasco, A., Sánchez-Pérez, H., Pryg, K., Shinnars, J., Murray, N., ... Alocilja, E. (2018). Magnetic Nanoparticle-Based Biosensing Assay Quantitatively Enhances Acid-Fast Bacilli Count in Paucibacillary Pulmonary Tuberculosis. *Biosensors*, 8(4), 128. doi:10.3390/bios8040128
- Gupta, S., & Kakkar, V. (2018). Recent technological advancements in tuberculosis diagnostics - A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 115, 14–29. doi:10.1016/j.bios.2018.05.017
- Gupta-Wright, A. & Lawn, S. D. (2015) Advances in the Diagnosis of HIV-Associated Tuberculosis. *EMJ Respi*, 3(1), 60-70. Retrieved from : <http://researchonline.lshtm.ac.uk/id/eprint/2235966/>
- Hongler, J., Musaazi, J., Ledergerber, B., Eberhard, N., Sekaggya-Wiltshire, C., Keller, P., ... Castelnuovo, B. (2018). Comparison

- of Löwenstein-Jensen and BACTEC MGIT 960 culture for *Mycobacterium tuberculosis* in people living with HIV. *HIV Medicine*. doi:10.1111/hiv.12635
19. Kik, S. V., Denkinger, C. M., Chedore, P., & Pai, M. (2014). Replacing smear microscopy for the diagnosis of tuberculosis: what is the market potential? *European Respiratory Journal*, 43(6), 1793–1796. doi:10.1183/09031936.00217313
 20. Kim, E. J., Kim, E. B., Lee, S. W., Cheon, S. A., Kim, H.-J., Lee, J., ... Park, T. J. (2017). An easy and sensitive sandwich assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B antigen using quantum dots and gold nanorods. *Biosensors and Bioelectronics*, 87, 150–156. doi:10.1016/j.bios.2016.08.034
 21. Koo, H. C., Park, Y. H., Ahn, J., Waters, W. R., Palmer, M. V., Hamilton, M. J., ... Davis, W. C. (2005). Use of rMPB70 Protein and ESAT-6 Peptide as Antigens for Comparison of the Enzyme-Linked Immunosorbent, Immunochromatographic, and Latex Bead Agglutination Assays for Serodiagnosis of Bovine Tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9), 4498–4506. doi:10.1128/jcm.43.9.4498-4506.2005
 22. Li, Z., Li, X., Zong, Y., Tan, G., Sun, Y., Lan, Y., ... Zheng, X. (2017). Solvothermal synthesis of nitrogen-doped graphene decorated by superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles and their applications as enhanced synergistic microwave absorbers. *Carbon*, 115, 493–502. doi:10.1016/j.carbon.2017.01.036
 23. López-Romero, W., Flores-Valdez, M. & Camacho-Villegas, T. (2019). Métodos actuales empleados para el diagnóstico de tuberculosis y su eficacia en diversos entornos clínicos. *Salud Jalisco*, 6(3), 170–180.
 24. Miodek, A., Mejri, N., Gomgnimbou, M., Sola, C., & Korri-Youssoufi, H. (2015). E-DNA Sensor of *Mycobacterium tuberculosis* Based on Electrochemical Assembly of Nanomaterials (MWCNTs/PPy/PAMAM). *Analytical Chemistry*, 87(18), 9257–9264. doi:10.1021/acs.analchem.5b01761
 25. Mohd Azmi, U., Yusof, N., Kusnin, N., Abdullah, J., Suraiya, S., Ong, P., ... Mohamad Fathil, M. (2018). Sandwich Electrochemical Immunosensor for Early Detection of Tuberculosis Based on Graphene/Polyaniline-Modified Screen-Printed Gold Electrode. *Sensors*, 18(11), 3926. doi:10.3390/s18113926
 26. Mukundan, H., Price, D. N., Goertz, M., Parthasarathi, R., Montañó, G. A., Kumar, S., ... Swanson, B. I. (2012). Understanding the interaction of Lipoarabinomannan with membrane mimetic architectures. *Tuberculosis*, 92(1), 38–47. doi:10.1016/j.tube.2011.09.006
 27. Mulpur, P., Yadavilli, S., Mulpur, P., Kondiparthi, N., Sengupta, B., Rao, A. M., ... Kamisetty, V. (2015). Flexible Ag–C60 nanobiosensors based on surface plasmon coupled emission for clinical and forensic applications. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(38), 25049–25054. doi:10.1039/c5cp04268b
 28. Perumal, V., Saheed, M. S. M., Mohamed, N. M., Saheed, M. S. M., Murthe, S. S., Gopinath, S. C. B., & Chiu, J.-M. (2018). Gold nanorod embedded novel 3D graphene nanocomposite for selective bio-capture in rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biosensors and Bioelectronics*, 116, 116–122. doi:10.1016/j.bios.2018.05.042
 29. Petruccioli, E., Scriba, T. J., Petrone, L., Hatherill, M., Cirillo, D. M., Joosten, S. A., ... Goletti, D. (2016). Correlates of tuberculosis risk: Predictive biomarkers for progression to active tuberculosis. *European Respiratory Journal*, 48(6), 1751–1763. doi.org/10.1183/13993003.01012-2016
 30. Ramírez-Priego, P., Martens, D., Elamin, A. A., Soetaert, P., Van Roy, W., Vos, R., ... Lechuga, L. M. (2018). Label-free and real-time detection of tuberculosis in human urine samples using a nanophotonic point-of-care platform. *ACS Sensors*. doi:10.1021/acssensors.8b00393
 31. Secretaría de Salud & Dirección General de Epidemiología. (2020). Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información | Secretaría de Salud | Gobierno | gob.mx. Retrieved April 23, 2020, from <https://www.gob.mx/salud/documentos/boletinepidemiologico-sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica-sistema-unico-de-informacion-231750>
 32. Wei, Q., Xiang, Z., He, J., Wang, G., Li, H., Qian, Z., & Yang, M. (2010). Dumbbell-like Au-Fe₃O₄ nanoparticles as label for the preparation of electrochemical immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(2), 627–631. doi:10.1016/j.bios.2010.07.012
 33. WHO. (2019). Regional and global profiles. *Global Status Report of Tuberculosis*, 251–258. Retrieved from www.who.int/tb/data
 34. WHO. (2020). México. *Global Status Report of Tuberculosis*. Retrieved from www.who.int/tb/data
 35. Zhou, Q., Xue, H., Zhang, Y., Lv, Y., Li, H., Liu, S., ... Zhang, Y. (2018). Metal-Free All-Carbon Nanohybrid for Ultrasensitive Photoelectrochemical Immunosensing of alpha-Fetoprotein. *ACS Sensors*, 3(7), 1385–1391. doi:10.1021/acssensors.8b00307