

LA MIELOPEROXIDASA: UNA ENZIMA LOABLE DE IMPLEMENTAR EN ESTUDIOS DE PACIENTES CON LA COVID-19.

Ahmed Amaury Ruiz Moré¹ <https://orcid.org/0000-0003-1838-4607> ahmedamaury9@gmail.com

Lidia González Méndez² <http://orcid.org/0000-0003-0583-1738>, lgmendez@nauta.cu

Elena Carvajal Ciomina³ <https://orcid.org/0000-0001-7158-2464>, elena.carvajal@nauta.cu

Departamento de Investigaciones Biomédicas, Dirección de Ciencia y Técnica de la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Cuba.

Autor para la correspondencia: ahmed74@nauta.cu, Teléfono: 5439561

Resumen

La pandemia COVID-19 ha venido a socavar la salud física y espiritual del ser humano. Muchas evidencias apuntan el rol de las trampas extracelulares de neutrófilos y su arma de combate: la enzima Mieloperoxidasa, como parte de la respuesta inmunológica frente a esta infección letal. **Objetivos:** Comprobar el ajuste del método implementado al protocolo de Validación y determinar los valores de referencia de la enzima Mieloperoxidasa. **Método:** En el Departamento de Investigaciones Biomédicas de la Dirección de Ciencia e Innovación Tecnológica, Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara se implementó la determinación de la enzima Mieloperoxidasa, se realizó su validación analítica y la estimación de los valores de referencia en una población supuestamente sana. Para ello se realizó un protocolo de investigación cuantitativo, transversal y descriptivo que involucró pacientes procedentes del Banco de Sangre Provincial. Como muestras biológicas se emplearon plasma sanguíneo a los que se le realizó la estimación de la actividad mieloperoxidásica. **Resultados:** Los parámetros analíticos de linealidad, precisión y veracidad del método se correspondieron con las exigencias de los estándares internacionales. **Conclusiones:** Los valores de referencia guardan relación con otros reportes y contribuyen a la evaluación del estado paciente y como marcador pronóstico de gravedad del paciente afectado por la COVID-19.

Palabras claves: COVID-19, Mieloperoxidasa, Actividad enzimática, Validación, Valores de referencia

Abstract/Summary

The COVID-19 pandemic has come to undermine the physical and spiritual health of the human being. Much evidence points to the role of extracellular neutrophil traps and their combat weapon: the Myeloperoxidase enzyme, as part of the immune response to this lethal infection. **Objectives:** Check the adjustment of the implemented method to the Validation protocol and determine the reference values of the Myeloperoxidase enzyme. **Methods:** In the Department of Biomedical Research of the University of Medical Sciences of Villa Clara, the determination of the Myeloperoxidase enzyme was implemented; its analytical validation and the estimation of the reference values in a supposedly healthy population was carried out. For this, a quantitative, transversal and descriptive research protocol was carried out that involved patients from the Provincial Blood Bank. Blood plasma was used as biological samples, and the myeloperoxidase activity was estimated. **Results:** The analytical parameters of linearity, precision and veracity of the method corresponded to the requirements of international standards. **Conclusions:** The reference values are related to other reports and contribute to the evaluation of the status and prognostic marker of severity of the patient affected by COVID-19.

Keywords: COVID-19, Myeloperoxidase, Enzyme activity, Validation, Reference values

Introducción

La COVID-19 es una enfermedad causada por el síndrome respiratorio agudo severo coronavirus tipo 2 (SARS-CoV-2), declarada como pandemia en marzo 2020, extendiéndose rápidamente al mundo y de fácil propagación.¹ Ha tenido un impacto desfavorable en la salud de las personas ocasionando enfermedades respiratorias graves, gran angustia asociada y otras complicaciones.^{2,3}

La respuesta exacerbada del huésped involucra una tormenta de citocinas en la COVID-19 severo ⁴ como consecuencia de la entrada del virus SARS-CoV-2 en las células alveolares, donde se infiltran un número considerable de neutrófilos.⁵ Estos liberan Mieloperoxidasa que en presencia de Cl^- , cataliza la generación de ácido hipocloroso (HOCl) a partir de H_2O_2 , importante oxidante antimicrobiano como parte de la respuesta del sistema inmunológico.⁶

Una afectación significativa de la proliferación de HOCl es la función de la Hb, que puede estar relacionada con la hipoxia observada en la COVID-19.⁷ Se ha informado que muchos pacientes con la COVID-19 tenían oxígeno periférico bajo. ⁸

Por otro lado, la activación de neutrófilos se correlacionó con 17 genes asociados a las trampas extracelular de neutrófilos (NET) en pacientes con la COVID-19. ⁹ Cuando no se regulan adecuadamente, los NET tienen el potencial de propagar la inflamación y la trombosis microvascular, incluso en los pulmones de pacientes con síndrome de dificultad respiratoria aguda.¹⁰ Se encontraron niveles elevados en el suero de pacientes con la COVID-19, de dos marcadores séricos de trampas extracelulares de neutrófilos (NET), la mieloperoxidasa (MPO)-ADN y la histona citrulinada. Estas NET son responsables del inicio y acreción de eventos trombóticos en arterias, venas y, particularmente pertinente a COVID-19, la microvasculatura, donde la enfermedad trombótica puede producirse. impulsar el daño de los órganos terminales en los pulmones, el corazón, los riñones, y otros órganos. ¹⁰.

Como se aprecia la Mieloperoxidasa juega un rol preponderante en la fisiopatología de la COVID-19. Así, en el Departamento de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara se aplica un método espectrofotométrico para determinar la actividad de la Mieloperoxidasa; de modo que se garanticen resultados confiables. Por ello se hace necesario la implementación de una estrategia de Validación¹¹ y la estimación de

los valores de referencia, dos de los aspectos fundamentales para evaluar los niveles de la mencionada enzima.

Motivados por lo anterior se hace pertinente la aplicación de un protocolo de validación, que permita demostrar la veracidad y robustez del método enzimático para la estimación de la actividad de la Mieloperoxidasa en una muestra de referencia. Dichos parámetros serán útiles para la determinación de dicha enzima en pacientes enfermos o en seguimiento de COVID-19.

Objetivos: Comprobar el ajuste del método implementado al protocolo de Validación y determinar los valores de referencia de la enzima Mieloperoxidasa.

Material y Métodos

Se realiza un estudio cuantitativo, descriptivo, transversal, como parte de la estimación de los valores de referencia, en una muestra de pacientes supuestamente sanos procedentes del Banco de Sangre Provincial de Villa Clara, entre los meses octubre de 2019 y marzo de 2020. La inclusión de los individuos de referencia se hizo acorde a las normativas para la aceptación de donantes de dicha institución.

Previamente se realiza la validación de un método analítico para determinar la actividad enzimática de mieloperoxidasa en muestras de suero o plasma sanguíneo humano, teniendo en cuenta recomendaciones del CECMED y otras Autoridades en el tema.¹²⁻²¹

Para ello se emplean los siguientes recursos materiales:

➤ Equipos

- Balanza analítica con precisión de 0,1 mg.
- Espectrofotómetro UV- VIS modelo T-60 PG, USA.
- Medidor de pH modelo R 516.
- Cronómetro.
- Campana de extracción.
- Centrífuga refrigerada modelo Sigma 2-16KL.

➤ Materiales

- Tubos de ensayos.
- Pipetas de graduadas de 25 mL.
- Pipetas automáticas de 100, 500 y 5000 μ L.

- Puntas tipo eppendorff.
- Matraces aforados de 100 mL, 500mL y 1000 mL.
- Beakers de 100 mL, 500mL y 1000 mL.
- Espátulas.
- Gradilla.
- Embudo.
- Agitadores de cristal.
- Gotero.

➤ Reactivos

- Buffer fosfato (KH_2PO_4 , K_2HPO_4) 0,05 M; pH 6,0
- Peroxidasa de rábano (siglas del inglés, HRP) (EC:1.11.1.7): liofilizado comercial de HRP (BDH Chemicals Ltd; 820 U/mg): se pesa 6 mg y se reconstituye con buffer fosfato 0,05 M; pH 6,0 hasta 25 mL. La solución resultante tiene una actividad de 19,68 U/mL. Con ésta última se preparan los diferentes patrones con actividades asignadas de 0,125-2 U/mL.
- Solución de o-DA (0,65 mM) tamponada con buffer fosfato 0,05 M; pH 6,0. Ésta solución debe prepararse diariamente y deberá conservarse en frasco ámbar.
- Solución tamponada de H_2O_2 (30 mM): Para la titulación del peróxido del frasco originario se toma 40 uL de H_2O_2 (30%) y disolver hasta 25 mL con buffer fosfato 0,05 M, pH 6,0. Calcular la concentración molar por método espectrofotométrico a 240 nm. A partir de éste resultado preparar una solución stock de H_2O_2 a 30 mM. Mantener los frascos con tapa. Debido a la inestabilidad del H_2O_2 , éste procedimiento debe repetirse de un día a otro.

La obtención de la muestra de sangre la realiza el flebotomista del banco de sangre. De los plasmas remanentes de los donantes, posterior a los exámenes que se les realiza, se toman una alícuota de 1mL, y son almacenados a -70 °C hasta su posterior análisis.²²

El método analítico empleado para la determinación de Mieloperoxidasa fue el de Graff y colaboradores (1998) ²³, con ligeras modificaciones. Es un ensayo cinético continuo que utiliza como sustrato peróxido de hidrógeno (30 mM) y o-dianisidina (0,65 mmol/L), ambos en buffer fosfato 0,05 M; pH 6,0. Se basa en la oxidación de la o-dianisidina mediado la reducción del peróxido de hidrógeno, formándose un compuesto de color pardo con intensidad acorde a la actividad enzimática de la muestra. Para la determinación de la actividad se toma 100 µL de suero y se añade a 2850 µL de la solución de o-Dianisidina tamponada y seguidamente 50 µL de H_2O_2 (30 mM). Se lee en el espectrofotómetro a 460

nm a tiempo 0 y 3 min contra blanco de agua. Para la estandarización de la actividad mieloperoxidasa en unidades internacionales se requiere previamente realizar una curva patrón de Peroxidasa de rábano picante (HRP) liofilizada, en iguales condiciones del ensayo, pero sustituyendo la muestra de plasma por el patrón enzimático. Las muestras de referencia son procesadas de igual modo. La actividad enzimática se expresó en $\mu\text{moles de peróxido} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ de suero, lo que equivale a U/mL.

La curva patrón de Peroxidasa de rábano (HRP) fue realizada por triplicado en el rango de actividades entre 0,125 y 2 U/mL.

Evaluación de algunos parámetros del desempeño de la técnica

Para los estudios de linealidad se realizaron tres curvas de calibración en tres días diferentes. Teniendo en cuenta todos los valores experimentales se determinó la ecuación de la recta. Se determina el valor promedio de cada punto y se traza la curva de mejor ajuste. Se hallan los coeficientes de correlación y de determinación, así como la homogeneidad de varianzas y el coeficiente de variación de los factores de respuesta (CV_i). Se evalúan también la varianza de la pendiente de la línea de regresión, desviación estándar, desviación estándar relativa, límites de confianza de la pendiente y el grado de significación; y se verificó la proporcionalidad.

Se calcula el límite de detección mediante la realización de réplicas de un blanco de buffer mediante la expresión $(a + 3S_1)$, siendo a el promedio de las absorbancias obtenidas por el blanco y $S_1 = \sqrt{S_{xy}^2}$. El valor obtenido se expresó en concentración utilizando la ecuación de la recta. De modo similar se halla el límite de cuantificación pero mediante la expresión: $(a + 10S_1)$.

Para los estudios de precisión se mezclaron varias alícuotas de suero sanguíneo de pacientes supuestamente sanos. Dichas muestras deberán estar libres de hemólisis, lipemia e íctero.²⁴ Esta mezcla se dispensa en diversas copillas eppendorff y se almacenan a -70°C . A partir de las mismas se calcularon: repetibilidad ($CV_r\%$), reproducibilidad intermedia ($CV_{ri}\%$) y reproducibilidad ($CV_R\%$). Esta última de forma teórica por Horwitz: $CV_{Teo}\% = 2^{(1-0,5\log C)}$

Donde: C (valor de concentración media de todos los días)

Para analizar la veracidad se determina la recuperación, mediante la siguiente expresión:

$$\%_{\text{recobro}} = \left| \frac{\text{Valor}_{\text{verdadero}} - \text{Valor}_{\text{experimental}}}{\text{Valor}_{\text{verdadero}}} \right| * 100$$

Donde:

Valor_{verdadero} (valor de concentración supuestamente real)

Valor_{experimental} (valor de concentración calculado mediante la ecuación de la recta con la absorbancia obtenida en ese punto)

La selección de los individuos de referencia y los procedimientos bioestadísticos se harán según recomendaciones de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC), adoptadas de igual manera por la Asociación Americana de Química Clínica (AACC) y la Sociedad Española de Química Clínica y Biología Molecular (SEQC).²⁵

Para los cálculos y el análisis estadístico se utilizó el programa Microsoft® Office Excel 2013.

Resultados y Discusión

En la figura 1 se aprecia la curva de calibración para diferentes niveles de actividad enzimática.

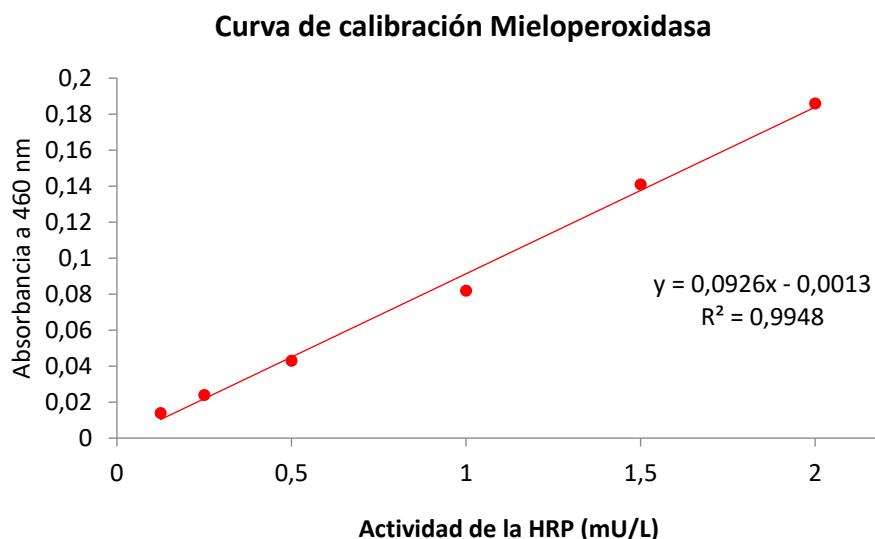


Figura 1. Curva de calibración.

De la evaluación estadística de la linealidad se obtiene:

- Ecuación de la recta: $y = 0,0926x - 0,0013$
- El coeficiente de correlación es de 0,9973 (debe ser $\geq 0,990$) y el coeficiente de determinación igual a 0,9948 (debe ser $> 0,98$), por lo que existe una correlación positiva entre la concentración y la absorbancia superior al 99,7 %.

- Análisis de varianza

Según el test de homogeneidad de varianzas de Cochran se obtuvo una $G_{exp} = 0,232$ y una $G_{tab} = 0,515$, como $G_{exp} < G_{tab}$ las varianzas de las concentraciones son homogéneas, es decir, el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados, en el rango de actividades analizado.

- Test de linealidad

- El $CV_f = 3,51 \%$, por tanto, se cumple que $CV_f \leq 5 \%$, lo que significa que existe linealidad en los datos obtenidos.

- La desviación estándar de la pendiente (S_b) es de $2,42 \cdot 10^{-5}$ y la desviación estándar relativa ($S_{b \text{ rel. } \%}$) es igual a $0,97 \%$. ($\leq 2 \%$)

- Los límites de confianza para $t_{tab} = 2,447$; con $n-2$ grados de libertad y $\alpha = 0,05$, están entre $0,0917$ y $0,0921$; no se incluye el cero.

- Para determinar el grado de significación, la $t_{exp} = 103,207$, como $t_{exp} > t_{tab}$ se acepta $H_1: b \neq 0$, por lo que existe regresión, la probabilidad de que $b \neq 0$ es superior al 95% .

Hasta este nivel la linealidad del método estuvo entre $125-2000 \text{ U/L}$, un amplio rango de actividades enzimáticas, lo cual es utilitario desde el punto de vista práctico pues no requiere hacer diluciones de muestras de modo frecuente.

- Test de proporcionalidad:

- Los límites de confianza del intercepto (a) para $t_{tab} = 2,447$ ($n-2$; $\alpha = 0,05$), se encuentran entre $-0,0024$ y $0,0002$, por tanto, incluyen el cero, por lo que se cumple la condición de proporcionalidad.

- Para determinar el grado de significación, la $t_{exp} = 0,44$, como $t_{tab} \geq t_{exp}$ se acepta $H_0: a=0$. Los parámetros calculados para evaluar la calidad de la regresión cumplen con los criterios de aceptación correspondientes, lo que indica que la técnica es lineal en el intervalo de concentraciones estudiado.

Una vez obtenida la curva es necesario conocer los límites mínimos en el rango de análisis, es decir, el límite de detección y el límite de cuantificación. Los resultados se reportan a continuación

Límite de detección: 9 U/L

Límite de cuantificación: 30 U/L

Estos resultados redimensionan la linealidad del método desde 30-2000 U/L.

En el estudio de precisión, los coeficientes de variación se comportaron de la siguiente forma: repetibilidad 2,30 %; reproducibilidad intermedia 3,56 % y reproducibilidad 6,09 %, donde hubo correspondencia con los supuestos teóricos: $CV_I\% < CV_{Ri}\% < CV_R\%$.

Respecto a la veracidad la conducción de ensayos de recuperación fue la única manera de determinar la veracidad del método pues no se tienen muestras certificadas. Así, el %recobro fue de 98,62%, que se encuentra entre el rango 98,00% – 102,00%. De acuerdo al resultado promedio de recuperación se puede decir que el método es veraz.

Por lo tanto la validación del método demuestra su eficacia con respecto a las condiciones óptimas escogidas, y que puede ser empleado con seguridad pues cumple con los requisitos de calidad. ²⁶⁻²⁹

La muestra de referencia quedó conformada por 123 individuos supuestamente sanos, con edades comprendidas entre 18 y 65 años, siguiendo la distribución mostrada en la figura 2.

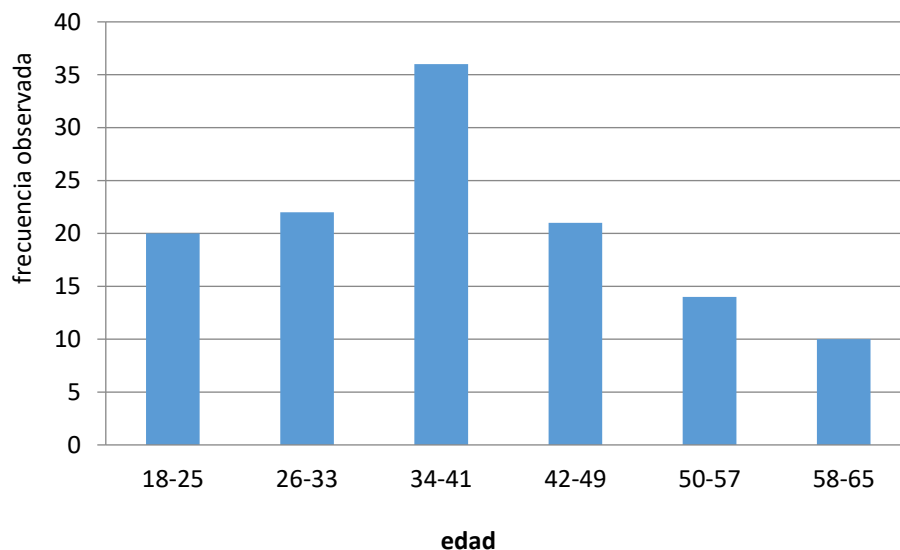


Figura 2. Distribución de edades en el grupo de referencia

Las actividades Mieloperoxidasa del grupo de referencia se distribuyeron de manera asimétrica (Figura 3), razón por lo cual para el cálculo de los valores de referencia es recomendado el empleo de métodos no paramétricos. Para ello empleamos la determinación de los límites interfartílicos entre 2,5 y 97,5 percentiles.

Esto resultó en Valores de Referencia para la población estudiada en el rango entre 110-960 U/L.

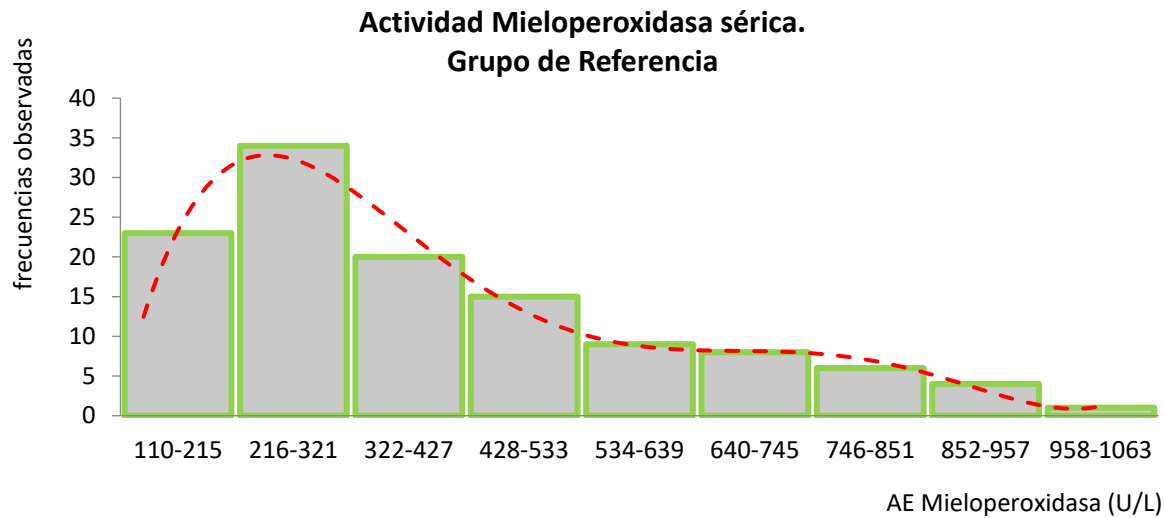


Figura 3. Distribución de valores de referencia para la AE de la mieloperoxidasa

Una investigación en un grupo de conejos infectados con *Lagovirus europaeus*/GI.1^a, un patógeno que causa gran mortalidad en breve tiempo, revelaron cifras entre 1070-2340 U/L, mientras que el grupo control tuvo actividades enzimáticas entre 1010-1270 U/L, pero emplearon como cromógeno bencidina en lugar de o-dianisidina.³⁰ Esto concuerda con el hecho que la mieloperoxidasa sea considerada una enzima marcadora de sepsis predictora de mortalidad, como plantean Schrijver y colaboradores (2017).³¹

Por otra parte, un estudio realizado en mujeres reporta un grupo control con niveles de mieloperoxidasa ($121,5 \pm 36,3$ U/L) que coinciden con una zona de la presente investigación (de 110-215 U/L) donde se reporta una alta frecuencia de valores.³²

Otro reporte refiere actividades mieloperoxidásicas del grupo control entre 34-324 U/L, con edades que circundan los 37 años como promedio, correspondiente con nuestro mayor grupo etáreo (34-41 años) (Figura 2).³³

Conclusiones

El método propuesto presenta adecuadas precisión y veracidad lo cual permite su aplicación para la determinación de la actividad de la enzima Mieloperoxidasa en muestras de suero o plasma. Por otro lado, se obtiene un intervalo de valores de referencia muy útil para la

determinación de Mieloperoxidasa en pacientes con la COVID-19, durante la enfermedad o como marcador pronóstico de gravedad.

Agradecimientos

DrC. María de los Ángeles Boffill Cárdenas, Lic. Isabel De Armas Fernández, Dra. Jenisel Prada Santana, de la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, y al Lic. Eddy Casareal Uyola y la Dra. Dra. Idamys Fernández Jure, Directora del Banco Provincial de Sangre de Villa Clara por su cooperación con la investigación.

Referencias bibliográficas

- 1.OMS. Informes de situación de la enfermedad por coronavirus (COVID-2019). Disponible en línea en: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus2019/situation-reports> (consultado el 30 de marzo de 2020).
2. OMS. Manejo clínico de la infección respiratoria aguda grave cuando se sospecha una infección por el nuevo coronavirus (nCoV). Ginebra: Organización Mundial de la Salud (2020). Disponible en línea en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330893> (consultado el 28 de enero de 2020).
3. Wang D, Hu B, Hu C, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*. 2020;323(11):1061–1069. doi:10.1001/jama.2020.1585
4. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ, et al. COVID-19: Consider Cytokine Storm Syndromes and Immunosuppression. *Lancet*. 2020 03 28;395(10229):1033-1034. PubMed PMID: 32192578.
5. Astuti I, Ysrafil. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes Metab Syndr*. 2020 Jul-Aug;14(4):407-412. doi: 10.1016/j.dsx.2020.04.020. Epub 2020 Apr 18. PMID: 32335367; PMCID: PMC7165108.
6. Denys GA, Devoe NC, Gudis P, May M, Allen RC, Stephens JT Jr. Mechanism of Microbicidal Action of E-101 Solution, a Myeloperoxidase-Mediated Antimicrobial, and Its Oxidative Products. *Infect Immun*. 2019 Jun 20;87(7):e00261-19. doi: 10.1128/IAI.00261-19. PMID: 31010816; PMCID: PMC6589053.
7. Goud PT, Bai D, Abu-Soud HM. A Multiple-Hit Hypothesis Involving Reactive Oxygen Species and Myeloperoxidase Explains Clinical Deterioration and Fatality in COVID-19. *Int J Biol Sci* 2021; 17(1):62-72. doi:10.7150/ijbs.51811. Available from <https://www.ijbs.com/v17p0062.htm>
8. Wilkerson RG, Adler JD, Shah NG, Brown R. Silent hypoxia: A harbinger of clinical deterioration in patients with COVID-19. *Am J Emerg Med*. 2020. Oct;38(10):2243.e5-2243.e6. doi: 10.1016/j.ajem.2020.05.044. Epub 2020 May 22. PMID: 32471783; PMCID: PMC7243756.
9. Wang J, Li Q, Yin Y, Zhang Y, Cao Y, Lin X, et al. Excessive Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19. *Front Immunol*. 2020 Aug 18;11:2063. doi: 10.3389/fimmu.2020.02063. PMID: 33013872; PMCID: PMC7461898.
10. Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, Gockman K, Zuo M, Madison JA, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) as markers of disease severity in COVID-19. *medRxiv [Preprint]*. 2020 Apr

- 14:2020.04.09.20059626. doi: 10.1101/2020.04.09.20059626. PMID: 32511633; PMCID: PMC7276989
11. NC-O.N.D.N. 2010. NC 368 Guía para la validación de métodos de ensayos químicos para alimentos. p. 48.
12. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos. Regulación D 20-17 Buenas Prácticas de Fabricación para Diagnosticadores. 2017. https://www.cecmed.cu/sites/default/files/adjuntos/Reglamentacion/res.no_.166.regul_.bpfdiagnostico.pdf
13. Food and Drug Administration (US). Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource [Internet]. EEUU: FDA; 2020 [citado 31 agosto 2020]. 55 p. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/pdf/Bookshelf_NBK326791.pdf.
14. International Medical Device Regulators Forum. Essential Principles of Safety and Performance of Medical Devices and IVD Medical Devices. IMDRF/GRRP WG/N47:2018
15. International Medical Device Regulators Forum. Principles of Labelling for Medical Devices and IVD Medical Devices. IMDRF/GRRP WG/N52:2019.
16. ISO 14001:2015 Sistemas de gestión ambiental — Requisitos con orientación para su uso. <https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:14001:ed-3:v1:es>
17. ISO 16142-2:2017 Medical devices - Recognized essential principles of safety and performance of medical devices - Part 2: General essential principles and additional specific essential principles for all IVD medical devices and guidance on the selection of standards. <https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:16142:-2:ed-1:v1:en>
18. ISO 14971:2019 Medical devices — Application of risk management to medical devices. <https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:14971:ed-3:v1:en>
19. ISO 35001:2019 Biorisk management for laboratories and other related organizations. <https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:35001:ed-1:v1:en>
20. ISO 15190:2020 Medical laboratories — Requirements for safety. <https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:15190:ed-2:v1:en>
21. ISO/IEC Guide 63:2019. Guide to the development and inclusion of aspects of safety in International Standards for medical devices.) <https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso-iec:guide:63:ed-3:v1:en>
22. ISO/TS 20658:2017 Medical laboratories — Requirements for collection, transport, receipt, and handling of samples. <https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:ts:20658:ed-1:v1:en>
23. Graff G, Gamache DA, Brady MT, Spellman JM, Yanni JM. Improved myeloperoxidase assay for quantitation of neutrophil influx in a rat model of endotoxin-induced uveitis. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1998 Apr;39(3):169-78. doi: 10.1016/s1056-8719(98)00023-9. PMID: 9741392.
24. Prada E, Blazquez R, Gutiérrez-Bassini G, Morancho J, Jou J.M, Ramón F, et. al. Control interno de la calidad vs control externo de la calidad. *Rev Lab Clin*. 2016; 9(2):54-59.)
25. Horowitz GL. Reference Intervals: Practical Aspects. *EJIFCC*. 2008 Oct 16;19(2):95-105. PMID: 27683304; PMCID: PMC4975204.
26. NC-ISO/IEC 17025:2017 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
27. NC-ISO 15189:2016 Laboratorios clínicos – Requisitos para la calidad y la competencia.
28. NC-ISO 23640:2018 Dispositivos médicos para diagnóstico in vitro. Evaluación de la estabilidad de los reactivos para diagnóstico in vitro
29. NC-ISO 13485:2018 Equipos Médicos – Sistemas de Gestión de la Calidad. Requisitos para propósitos reguladores.

30. Hryniewicz R, Bębnowska D, Niedźwiedzka-Rystwej P. Myeloperoxidase and Lysozymes as a Pivotal Hallmark of Immunity Status in Rabbits. *Animals (Basel)*. 2020 Sep 4;10(9):1581. doi: 10.3390/ani10091581. PMID: 32899838; PMCID: PMC7552177.
31. Schrijver IT, Kemperman H, Roest M, Kesecioglu J, de Lange DW. Myeloperoxidase can differentiate between sepsis and non-infectious SIRS and predicts mortality in intensive care patients with SIRS. *Intensive Care Med Exp*. 2017 Sep 15;5(1):43. doi: 10.1186/s40635-017-0157-y. PMID: 28916973; PMCID: PMC5602808.
32. Ege S, Bademkiran MH, Peker N, Erdem S, Bağlı İ, Köçeroğlu R, et al. Evaluation of catalase, myeloperoxidase and ferroxidase values in pregnant women with hyperemesis gravidarum. *Ginekol Pol*. 2019;90(11):651-655. doi: 10.5603/GP.2019.0110. PMID: 31802466.
33. Yapur V, Bustos M, Di Carlo M, López F, Vázquez M, Negri G. Niveles séricos de ceruloplasmina y mieloperoxidasa en pacientes con enfermedad coronaria crónica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, vol. 47, núm. 1, 2013, pp. 53-59.