

## ARTÍCULO ORIGINAL

# Estimación de valores de referencia de la enzima mieloperoxidasa: biomarcador de deterioro clínico en pacientes con COVID-19

Ahmed Amaury Ruiz Moré<sup>1\*</sup> , Lidia González Méndez<sup>1</sup> , Elena Carvajal Ciomina<sup>1</sup> , Isabel De Armas Fernández<sup>1</sup> , José Ramón Valdés Utrera<sup>1</sup> , Elizabeth Machín Parapar<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Santa Clara, Villa Clara, Cuba

<sup>2</sup>Hospital Provincial Ginecoobstétrico Universitario “Mariana Grajales”, Santa Clara, Villa Clara, Cuba

\*Ahmed Amaury Ruiz Moré. [ahmedamaury9@gmail.com](mailto:ahmedamaury9@gmail.com)

Recibido: 25/04/2022 - Aprobado: 20/09/2022

## RESUMEN

**Introducción:** la pandemia de 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.

**Objetivo:** determinar los valores de referencia de la enzima mieloperoxidasa, biomarcador para la evaluación del deterioro clínico en pacientes con COVID-19.

**Métodos:** en el Departamento de Investigaciones Biomédicas de la Dirección de Ciencia e Innovación Tecnológica de la 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 esto se realizó un protocolo de investigación cuantitativo, transversal y descriptivo que involucró pacientes procedentes del Banco de Sangre Provincial. Como muestra biológica se empleó plasma sanguíneo, al que se le realizó la estimación de la actividad mieloperoxidásica. Se determinaron los límites interfractílicos entre 2,5 y 97,5 percentiles.

**Resultados:** los parámetros analíticos de linealidad, precisión y veracidad del método se correspondieron con las exigencias de los estándares internacionales. Los valores de referencia para la población sana estudiada estuvieron en el rango entre 110 y 960U/l.

**Conclusiones:** los valores de referencia guardan relación con otros informes y contribuyen a la evaluación del estado paciente y como biomarcador pronóstico de gravedad del paciente afectado por la COVID-19.

**Palabras clave:** COVID-19; mieloperoxidasa; actividad enzimática; validación; valores de referencia

## ABSTRACT

**Introduction:** the COVID-19 pandemic has come to undermine human physical and spiritual health. Many evidences point to the role of neutrophil extracellular traps and

their combat weapon: Myeloperoxidase enzyme, as part of the immune response against this lethal infection.

**Objective:** to determine the reference values of the enzyme myeloperoxidase, biomarker for the evaluation of clinical deterioration in patients with Covid-19.

**Methods:** in the Department of Biomedical Research of the Direction of Science and Technological Innovation, University of Medical Sciences of Villa Clara, the determination of the enzyme Myeloperoxidase was implemented, its analytical validation and the estimation of reference values in a supposedly healthy population were carried out. For this purpose, a quantitative, transversal and descriptive research protocol was carried out involving patients from the Provincial Blood Bank. Blood plasma was used as a biological sample and myeloperoxidase activity was estimated. Interfractal limits were determined between 2.5 and 97.5 percentiles.

**Results:** the analytical parameters of linearity, precision and trueness of the method corresponded to the requirements of international standards. The reference values for the healthy population studied were in the range between 110-960 U/L.

**Conclusions:** the reference values are related to other reports and contribute to the evaluation of patient status and as a prognostic biomarker of severity of the patient affected by COVID-19.

**Key words:** COVID-19; myeloperoxidase; enzyme activity; validation; reference values

## INTRODUCCIÓN

La COVID-19 es una enfermedad causada por un coronavirus tipo 2 (SARS-CoV-2) que fue declarada como pandemia en marzo de 2020, se extendió rápidamente al mundo y es de fácil propagación.<sup>(1)</sup> La mayoría de las personas infectadas experimentan una enfermedad respiratoria de ligera a moderada; sin embargo, algunas enferman gravemente. Ha tenido un impacto desfavorable en la salud de las personas que transitan con enfermedades respiratorias graves, gran angustia asociada y otras complicaciones.<sup>(2)</sup>

La respuesta exacerbada del hospedero involucra una tormenta de citocinas en la COVID-19 severa<sup>(2)</sup> como consecuencia de la entrada del virus SARS-CoV-2 en las células alveolares, en las que se infiltra un número considerable de neutrófilos<sup>(3)</sup> que liberan mieloperoxidasa que, en presencia de Cl<sup>-</sup>, cataliza la generación de ácido hipocloroso (HOCl) a partir de peróxido de hidrógeno o agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) importante oxidante antimicrobiano como parte de la respuesta del sistema inmunológico.<sup>(4)</sup>

Una afectación significativa de la proliferación de HOCl es la función de la hemoglobina, que puede estar relacionada con la hipoxia observada en la COVID-19. Se ha informado que muchos pacientes con la COVID-19 tenían oxígeno periférico bajo.<sup>(5)</sup>

Por otro lado, la activación de neutrófilos se correlacionó con 17 genes asociados a las trampas extracelulares de neutrófilos (NET) en pacientes con la COVID-19.<sup>(6)</sup> 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.<sup>(7)</sup> Relacionado con lo anterior se encontraron niveles elevados en el suero de pacientes con la COVID-19 de dos marcadores séricos de NET: la mieloperoxidasa (MPO)-ADN y la histona citrulinada. Estas NET son responsables del inicio y la acreción de eventos trombóticos en arterias, venas y, particularmente pertinente a la COVID-

19, en la microvasculatura, en la que la enfermedad trombótica puede producirse e impulsar el daño de los órganos terminales en los pulmones, el corazón, los riñones y otros órganos.<sup>(7)</sup>

La enzima mieloperoxidasa juega un rol preponderante en la fisiopatología de la COVID-19. 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 y garantizar resultados confiables. Se hacen necesarios la implementación de una estrategia de validación<sup>(8)</sup> y la estimación de los valores de referencia, dos de los aspectos fundamentales para evaluar los niveles de la esta enzima.

Se hace pertinente la aplicación de un protocolo de validación que permita demostrar la veracidad y la robustez del método enzimático para la estimación de la actividad de la mieloperoxidasa en una muestra de referencia. Estos parámetros serán útiles para su determinación en pacientes enfermos o en seguimiento de COVID-19 como una señal de alarma de su deterioro clínico.

## MÉTODOS

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

Previamente se realizó la validación de un método analítico para determinar la actividad enzimática de mieloperoxidasa en muestras de suero o plasma sanguíneo humano; se tuvieron en cuenta las recomendaciones del Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED) y de otras autoridades en el tema.<sup>(9,10,11,12,13,14)</sup>

Se emplearon los siguientes reactivos:

- Solución amortiguadora o tampón fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 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 tampón 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 tampón fosfato 0,05 M; pH 6,0. Esta solución debe prepararse diariamente y deberá conservarse en frasco ámbar.

Solución tamponada de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 mM): para la titulación del peróxido del frasco originario se toman 40  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%) y disolver hasta 25 ml con tampón fosfato 0,05 M, pH 6,0. Calcular la concentración molar por método espectrofotométrico a 240 nm. A partir de este resultado preparar una solución stock de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 30 mM. Mantener los frascos con tapa. Debido a la inestabilidad del  $\text{H}_2\text{O}_2$  este procedimiento debe repetirse de un día a otro.

La obtención de la muestra de sangre la realiza el técnico 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 se almacena a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su posterior análisis.<sup>(15)</sup> Estas muestras estaban libres de hemólisis, lipemia e íctero.

El método analítico empleado para la determinación de mieloperoxidasa fue el de Graff y colaboradores (1998),<sup>(16)</sup> 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 tampón fosfato 0,05 M; pH 6,0. Se basa en la oxidación de la o-dianisidina mediada la reducción del peróxido de hidrógeno, que forma un compuesto de color pardo con intensidad acorde a la actividad enzimática de la muestra. Para la determinación de la actividad se toman 100 µl de suero y se añade a 2 850 µl de la solución de o-dianisidina tamponada y seguidamente 50 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 mM). Se lee en el espectrofotómetro a 460 nm a tiempo cero y tres minutos 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 se procesan de igual modo. La actividad enzimática se expresó en µmoles de peróxido/min/ml 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 2kU/l.

### **Evaluación de 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 el valor promedio de cada punto y se trazó la curva de mejor ajuste. Se hallaron los coeficientes de correlación y de determinación, así como la homogeneidad de varianzas y el coeficiente de variación de los factores de respuesta (CV<sub>f</sub>). Se evaluaron también la varianza de la pendiente de la línea de regresión, la desviación estándar, la desviación estándar relativa, los límites de confianza de la pendiente y el grado de significación y se verificó la proporcionalidad.

Además, se calculó el límite de detección mediante la realización de réplicas de un blanco del tampón mediante la expresión  $(a+3S_1)$ , que es el promedio de las absorbancias obtenidas por el blanco y  $S_1 = \sqrt{S_{x/y}}$ .<sup>(2)</sup> El valor obtenido se expresó en concentración a través de la ecuación de la recta. De modo similar se halló 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.<sup>(17)</sup> Esta mezcla se dispensarizó en alícuotas de 1,5ml que se almacenaron a -70°C, a partir de las que se calcularon: la repetibilidad (CVR%), la reproducibilidad intermedia (CVRi%) y la reproducibilidad (CVR%), 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 determinó 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<sub>verdadero</sub> (valor de concentración supuestamente real)

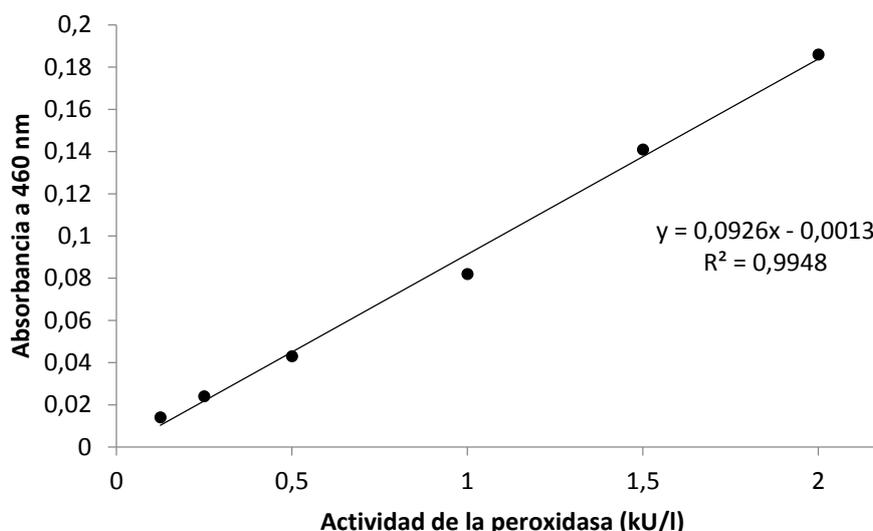
Valor<sub>experimental</sub> (valor de concentración calculado mediante la ecuación de la recta con la absorbancia obtenida en ese punto).

La selección de los individuos de referencia y los procedimientos bioestadísticos se llevaron a cabo según las 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).<sup>(18)</sup>

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

## RESULTADOS

El ensayo de la actividad enzimática a las concentraciones ensayadas se ajustó a un modelo lineal con una  $R^2=0,9948$  (Figura 1).



**Figura 1.** Curva de calibración de mieloperoxidasa para niveles de actividad comprendidos entre 0,125 y 2 kU/l (125U/l y 2 000 U/l, respectivamente)

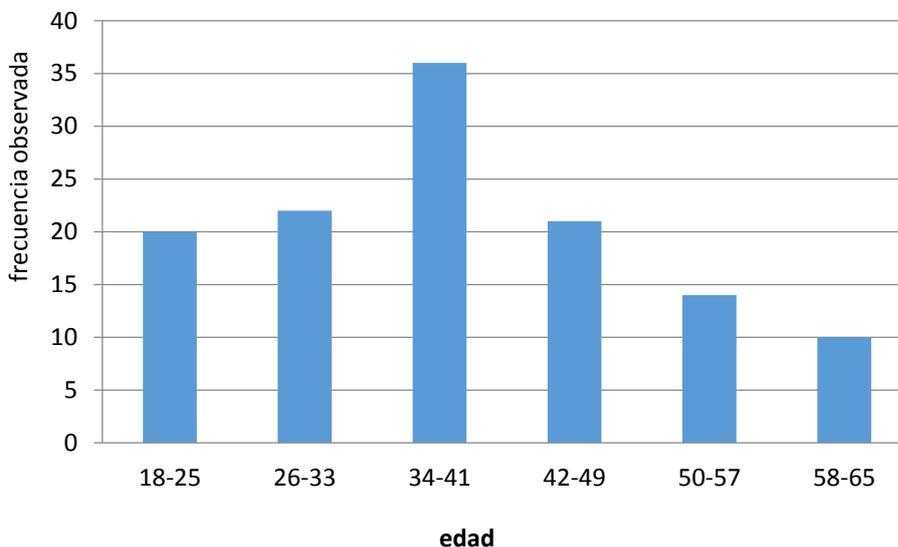
Se obtienen los siguientes parámetros de linealidad:

- Coeficiente de correlación: 0,9973
- Coeficiente de determinación: 0,9948
- Análisis de varianza mediante la prueba de homogeneidad de Cochran:  $G_{exp}=0,232$
- Prueba de linealidad mediante el coeficiente de variación de los factores respuesta ( $CV_f$ ) fue de 3,51%; la desviación estándar de la pendiente ( $S_b$ ) de  $2,42 \cdot 10^{-5}$  y la desviación estándar relativa ( $S_{b\ rel. \%}$ ) fue igual a 0,97%
- Los límites de confianza se encontraron entre 0,0917 y 0,0921 para  $t_{tab}= 2,447$ ; con  $n-2$  grados de libertad y  $\alpha= 0,05$ ; además, la  $t_{exp}$  fue de 103,207
- Prueba de proporcionalidad, mediante el cálculo de los límites de confianza del intercepto ( $a$ ) se encontraron entre -0,0024 y 0,0002, para  $t_{tab}= 2,447$  ( $n-2$ ;  $\alpha= 0,05$ ). Se obtuvo, además, una  $t_{exp}= 0,44$ .

Por lo anterior se establece como intervalo de linealidad entre 0,125 y 2,000 kU/l (125 U/l y 2 000 U/l, respectivamente), según el sistema analítico empleado. Los límites de detección y cuantificación fueron 9 U/l y 30 U/l, respectivamente.

En el estudio de precisión los coeficientes de variación indicaron una repetibilidad de 2,30%, una reproducibilidad intermedia de 3,56% y una reproducibilidad de 6,09%. El por ciento de recobrado fue de 98,62%.

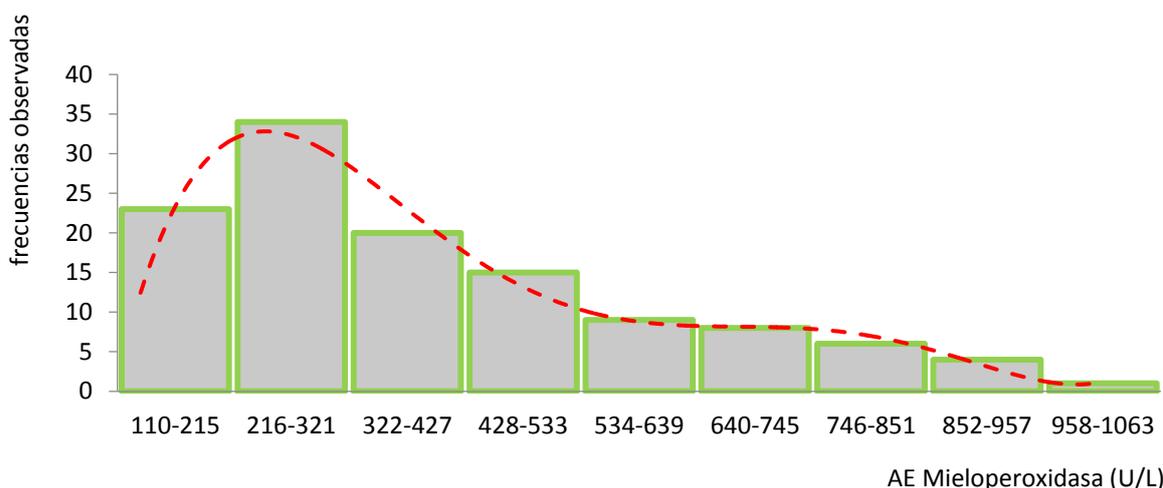
La muestra de referencia quedó conformada por 123 individuos supuestamente sanos, con edades comprendidas entre 18 y 65 años (Figura 2).



**Figura 2.** Distribución de frecuencia de los grupos etáreos incluidos en el grupo de referencia

Fuente: datos de la investigación aportados por el Banco de Sangre Provincial de Villa Clara

Se obtuvieron valores de referencia para la población estudiada en el rango entre 110-960 U/l (Figura 3).



**Figura 3.** Distribución de los valores de referencia de mieloperoxidasa en pacientes supuestamente sanos (grupo de referencia)

Fuente: datos de la investigación aportados por el Banco de Sangre Provincial de Villa Clara

## DISCUSIÓN

Para la implementación de un método en el laboratorio es esencial el análisis de la respuesta físico-química que se mide respecto al analito que se cuantifica. La

linealidad obtenida en la curva de calibración de la mieloperoxidasa (Figura 1) se corrobora con la obtención de un coeficiente de correlación superior a 0,990 y un coeficiente de determinación que supera el valor 0,98, por lo que existe una correlación positiva entre la concentración y la absorbancia, superior al 99,7%.<sup>(19,20,21)</sup>

Lo anterior se corresponde con el análisis de varianza en el que la  $G_{exp} < G_{tab}$ , para una  $G_{tab} = 0,515$ . Esto se significa que las varianzas de las concentraciones son homogéneas, es decir, el factor concentración no influyó en la variabilidad de los resultados en el rango de actividades enzimáticas entre 0,125 y 2,00 mU/l, criterio que refuerza la linealidad del método.<sup>(19,20,21)</sup>

La validación del método demuestra su eficacia con respecto a las condiciones óptimas escogidas y demuestra que puede ser empleado con seguridad porque cumple con los requisitos de calidad.<sup>(19,20,21)</sup>

La prueba de linealidad permitió corroborar estadísticamente la evaluación visual de la curva de calibración; así, el  $CV_f$  inferior al 5% fue indicativo de que existe linealidad en los datos obtenidos. Para la pendiente de la recta se obtuvieron parámetros en el rango de lo normado:  $S_{b\ rel.} \% \leq 2\%$  y los límites de confianza para  $t_{exp}$  entre 0,0917 y 0,0921 (sin incluir el cero); así como una  $t_{exp} > t_{tab}$ , lo que se corresponde con una probabilidad de que  $b$  sea diferente de cero, superior al 95%.<sup>(19,20,21)</sup>

Hasta este nivel la linealidad del método enmarca un amplio rango de actividades enzimáticas, lo que es utilitario desde el punto de vista práctico porque no requiere hacer diluciones de muestras de modo frecuente.

La prueba de proporcionalidad también fue favorable porque los límites de confianza del intercepto ( $a$ ) incluyeron al valor cero, lo que se corrobora con el cálculo del estadígrafo  $t$ , donde la  $t_{tab}$  fue mayor a la  $t_{exp}$ , condición para que se aceptara la hipótesis nula  $H_0: a=0$ . Se puede aseverar que los parámetros calculados para evaluar la calidad de la regresión cumplieron con los criterios de aceptación correspondientes, lo que indicó que la curva de calibración de mieloperoxidasa es lineal en el intervalo de concentraciones estudiado.<sup>(19,20,21)</sup>

El hallazgo experimental de límites de detección y cuantificación de 9 U/l y 30 U/l, respectivamente, redimensionan la linealidad del método desde 30-2000 U/l. De esta manera, valores inferiores a 30 U/l deben informarse como  $<30$  U/l y en los valores que sobrepasen el rango informado debe repetirse el ensayo, pero a partir de diluciones de la muestra de suero originaria, con el diluyente adecuado, bien solución salina al 0,9% o la solución tampón.

En el estudio de precisión se obtuvieron valores de repetibilidad, reproducibilidad intermedia y reproducibilidad en correspondencia con los supuestos teóricos:  $CV_r \% < CV_{Ri} \% < CV_R \%$ .<sup>(19,20,21)</sup>

De acuerdo con el resultado promedio de recuperación se puede afirmar que el método es veraz porque el por ciento de recobrado obtenido de 98,62% se encontró entre el 98 y el 102%. Es importante resaltar que se realizaron ensayos de recuperación porque no se tienen muestras certificadas en las que se refiera la actividad de la mieloperoxidasa.

La validación del método demuestra su eficacia con respecto a las condiciones óptimas escogidas y demuestra que puede ser empleado con seguridad porque cumple con los requisitos de calidad.<sup>(19,20,21)</sup>

La distribución asimétrica de los valores de actividad enzimática de la mieloperoxidasa en los individuos del grupo de referencia (Figura 3) orienta

hacia el cálculo de los valores de referencia mediante el empleo de métodos no paramétricos, por lo que se empleó la determinación de los límites interfractílicos inferior y superior entre los percentiles 2,5 y 97,5, respectivamente.

La estimación de la mieloperoxidasa es muy importante en la evaluación de la sepsis, lo que está en correspondencia con informes que confirmaron la factibilidad de su uso, incluso para evaluar sus complicaciones. Una investigación en un grupo de conejos infectados con *Lagovirus europaeus*/GI.1<sup>a</sup>, un organismo patógeno que causa gran mortalidad en breve tiempo, revelaron cifras entre 1 070 y 2 340 U/l, mientras que el grupo control tuvo actividades enzimáticas entre 1 010 y 1 270 U/l, pero emplearon como cromógeno bencidina en lugar de o-dianisidina.<sup>(22)</sup> Esto concuerda con el hecho de que la mieloperoxidasa sea considerada una enzima marcadora de sepsis y predictora de mortalidad, como plantean Schrijver y colaboradores.<sup>(23)</sup>

Un estudio realizado en mujeres informó 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 a 215 U/l), en la que se enmarca una alta frecuencia de valores.<sup>(24)</sup>

Otro estudio refiere actividades mieloperoxidásicas del grupo control entre 34 y 324 U/l, con edades que circundan los 37 años como promedio, correspondiente con el mayor grupo etáreo (de 34 a 41 años) (Figura 2).<sup>(25)</sup>

Estos resultados son importantes para evaluar los niveles enzimáticos de mieloperoxidasa en pacientes que transitan con desbalance en los radicales libres y el consecuente estrés oxidativo, además de ser un excelente biomarcador de procesos inflamatorios, eventos que se manifiestan en pacientes con COVID-19.<sup>(26)</sup>

La formación de NET, en la que la MPO tiene un papel importante, ha aparecido en numerosos informes de enfermedades y morbilidades. Se observó formación de NET y complemento (C3, C5) en pacientes con COVID-19 y se asoció con la gravedad de la enfermedad. Los niveles de MPO-DNA fueron significativamente más altos en los casos graves de COVID-19 que en los leves.<sup>(27)</sup> Un estudio que investigó los mecanismos de trombosis en pacientes con COVID-19 informó una mayor formación de NET circulantes en estos pacientes, incluido un aumento de los complejos MPO-ADN (MPO asociada con NET).<sup>(28)</sup> Como catalizador de eventos trombóticos en COVID-19 se informó que los NET son una interacción entre plaquetas y neutrófilos en esta enfermedad.<sup>(29)</sup>

Los NET pueden ser desencadenados por citocinas, plaquetas, óxido nítrico y peroxinitrito, inductores de NET como IL-6 and TNF $\alpha$ .<sup>(29)</sup>

Cuando se emplea un ensayo de laboratorio en apoyo al diagnóstico médico es importante la determinación de los valores de referencia que incluyan pacientes de la población en los que se aplicará el mencionado ensayo; la llamada población de referencia. Cuando se evalúa un paciente enfermo cualquier resultado fuera del rango de referencia puede considerarse como alterado.<sup>(30)</sup>

## CONCLUSIONES

La determinación de mieloperoxidasa es muy oportuna desde el punto de vista clínico por el vínculo de parámetros inmunológicos e inflamatorios que caracterizan a la COVID-19: la tormenta de citoquinas, la generación de trampas extracelulares de neutrófilos y la liberación consecuente de la enzima. Se obtiene

un intervalo de valores de referencia muy útil para la evaluación de la mieloperoxidasa durante la enfermedad o como biomarcador pronóstico de gravedad, en el que la validación analítica del procedimiento experimental debe cumplir con los requisitos de calidad.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos por su cooperación con la investigación a: DrC. María de los Ángeles Boffill Cárdenas, Grupo InNOVAcEnz (Dra. Jenisel Prada Santana, Dra. Lilita Navarro Moreno, Dr. Orlando Chaviano Herrera), Lic. Luis Alberto Del Sol Fabregat, todos de la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara; Dra. Idamys Fernández Jure y Lic. Eddy Casarreal Uyola, del Banco de Sangre Provincial de Villa Clara.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud [Internet]. Ginebra: OMS; 2020 [actualizado 27/04/2020; citado 19/05/2022]. COVID-19: cronología de la actuación de la OMS; [aprox. 5 patallas]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/27-04-2020-who-timeline---covid-19>
2. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ, et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. Lancet [Internet]. 2020 [citado 19/05/2022];395(10229):1033–1034. Disponible en: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(20\)30628-0/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(20)30628-0/fulltext). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0)
3. Astuti I, Ysrafil. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. Diabetes Metab Syndr [Internet]. 2020 [citado 19/05/2022];14(4):407–412. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7165108/>. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.04.020>
4. 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 [Internet]. 2019 [citado 19/05/2022];87(7):e00261-19. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6589053/>. <https://doi.org/10.1128/IAI.00261-19>
5. Wilkerson RG, Adler JD, Shah NG, Brown R. Silent hypoxia: A harbinger of clinical deterioration in patients with COVID-19. Am J Emerg Med [Internet]. 2020 [citado 19/05/2022];38(10):2243.e5-2243.e6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7243756/>. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2020.05.044>
6. 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 [Internet]. 2020 [citado 19/05/2022];11:2063. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7461898/>. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02063>
7. 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 [Internet]. medRxiv [Preprint]. 2020 [citado 19/05/2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7276989/>. <https://doi.org/10.1101/2020.04.09.20059626>

8. Oficina Nacional de Normalización. Norma Cubana (NC) TS 368: 2010. Guía para la validación de métodos de ensayos químicos para alimentos. La Habana: Oficina Nacional de Normalización; 2010.
9. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos. Regulación D 20-17 Buenas Prácticas de Fabricación para Diagnosticadores [Internet]. La Habana: CECMED; 2017 [citado 19/05/2022]. Disponible en: [https://www.cecmed.cu/sites/default/files/adjuntos/Reglamentacion/res.no\\_166.regul\\_bpfdiagnosticadores.pdf](https://www.cecmed.cu/sites/default/files/adjuntos/Reglamentacion/res.no_166.regul_bpfdiagnosticadores.pdf)
10. FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource [Internet]. Bethesda: NIH; 2016 [citado 19/05/2022]. Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/pdf/Bookshelf\\_NBK326791.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/pdf/Bookshelf_NBK326791.pdf)
11. International Medical Device Regulators Forum. Principles of Labelling for Medical Devices and IVD Medical Devices [Internet]. Australia: IMDRF; 2019 [citado 19/05/2022]. Disponible en: <https://www.imdrf.org/sites/default/files/docs/imdrf/final/technical/imdrf-tech-190321-pl-md-ivd.pdf>
12. Organización Internacional de Normalización [Internet]. Ginebra: OIN; 2019 [citado 19/05/2022]. ISO 35001:2019(es) Gestión del riesgo biológico en laboratorios y otras organizaciones relacionadas; [aprox. 14 pantallas]. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:35001:ed-1:v1:es>
13. Organización Internacional de Normalización [Internet]. Ginebra: OIN; 2020 [citado 19/05/2022]. ISO 15190:2020 Laboratorios clínicos — Requisitos de seguridad; [aprox. 11 pantallas]. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:15190:ed-2:v1:es>
14. Organización Internacional de Normalización [Internet]. Ginebra: OIN; 2019 [citado 19/05/2022]. ISO/IEC Guide 63:2019(en). Guide to the development and inclusion of aspects of safety in International Standards for medical devices; [aprox. 8 antallas]. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso-iec:guide:63:ed-3:v1:en>
15. Organización Internacional de Normalización [Internet]. Ginebra: OIN; 2017 [citado 10/05/2022]. ISO/TS 20658:2017(en) Medical laboratories — Requirements for collection, transport, receipt, and handling of samples; [aprox. 7 pantallas]. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:ts:20658:ed-1:v1:en>
16. 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 [Internet]. 1998 [citado 19/05/2022];39(3):169–78. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9741392/>. [https://doi.org/10.1016/s1056-8719\(98\)00023-9](https://doi.org/10.1016/s1056-8719(98)00023-9)
17. Prada E, Blazquez R, Gutiérrez-Bassini G, Morancho J, Jou JM, Ramón F, et al. Control interno de la calidad vs control externo de la calidad. Rev Lab Clín [Internet]. 2016 [citado 19/05/2022];9(2):54–59. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-del-laboratorio-clinico-282-articulo-control-interno-calidad-vs-control-S1888400816300071>. <https://orcid.org/10.1016/j.labcli.2016.04.003>
18. Horowitz G. Reference Intervals: Practical Aspects. EJIFCC [Internet]. 2008 [citado 19/05/2022];19(2):95–105. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4975204/>
19. Organización Internacional de Normalización [Internet]. Ginebra: OIN; 2017 [citado 19/05/2022]. ISO/IEC 17025:2017(es) Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración; [aprox. 7 pantallas]. Disponible en: <https://dgn.isolutions.iso.org/obp/ui#iso:std:iso-iec:17025:ed-3:v2:es>

20. EUROLAB [Internet]. Estambul: EUROLAB; 2022 [citado 19/05/2022]. Dispositivos médicos de diagnóstico in vitro ISO 23640: evaluación de la estabilidad de los reactivos de diagnóstico in vitro; [aprox. 2 pantallas]. Disponible en: <https://www.laboratuar.com/es/testler/medikal-cihaz-testleri/iso-23640-in-vitro-diagnostik-tibbi-cihazlar---in-vitro-diagnostik-reaktiflerin-stabilitesinin-degerlendirilmesi/>
21. Organización Internacional de Normalización [Internet]. Ginebra: OIN; 2016 [citado 19/05/2022]. ISO 13485:2016(en) Medical devices — Quality management systems — Requirements for regulatory purposes: [aprox. 50 pantallas]. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:13485:ed-3:v1:en>
22. Hryniewicz R, Bębnowska D, Niedźwiedzka-Rystwej P. Myeloperoxidase and lysozymes as a pivotal hallmark of immunity status in rabbits. *Animals (Basel)* [Internet]. 2020 [citado 19/05/2022];10(9):1581. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7552177/>.  
<https://doi.org/10.3390/ani10091581>
23. 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* [Internet]. 2017 [citado 19/05/2022];5(1):43. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5602808/>.  
<https://doi.org/10.1186/s40635-017-0157-y>
24. 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* [Internet]. 2019 [citado 19/05/2022];90(11):651–655. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31802466/>.  
<https://doi.org/10.5603/GP.2019.0110>
25. Yapur VM, Bustos MF, Di Carlo MB, López Mingorance FN, Vázquez Blanco M, Negri GA. Niveles séricos de ceruloplasmina y mieloperoxidasa en pacientes con enfermedad coronaria crónica. *Acta Bioquím Clín Latinoam* [Internet]. 2013 [citado 19/05/2022];47(1):53–59. Disponible en: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-29572013000100008](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572013000100008)
26. Siraki AG. The many roles of myeloperoxidase: From inflammation and immunity to biomarkers, drug metabolism and drug discovery. *Redox Biol* [Internet]. 2021 [citado 19/05/2022];46:102109. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8403760/>.  
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102109>
27. Zhang Y, Han K, Du C, Li R, Liu J, Zeng H, et al. Carboxypeptidase B blocks ex vivo activation of the anaphylatoxin-neutrophil extracellular trap axis in neutrophils from COVID-19 patients. *Crit Care* [Internet]. 2021 [citado 19/05/2022];25(1):51. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7868871/>.  
<https://doi.org/10.1186/s13054-021-03482-z>
28. Zuo Y, Zuo M, Yalavarthi S, Gockman K, Madison J, Shi H, et al. Neutrophil extracellular traps and thrombosis in COVID-19. *J Thromb Thrombolysis* [Internet]. 2021 [citado 19/05/2022];51(2):446–53. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7642240/>.  
<https://doi.org/10.1007/s11239-020-02324-z>
29. Middleton EA, He XY, Denorme F, Campbell RA, Ng D, Salvatore SP, et al. Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Blood* [Internet]. 2020 [citado 19/05/2022];136(10):1169–1179. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7472714/>.

<https://doi.org/10.1182/blood.2020007008>

30. Algeciras-Schimnich A. Intervalos de Referencia: conceptos, interpretación y protocolos de verificación recomendados por CLSI EP28-A3c [Internet]. Washington: American Association for Clinical Chemistry; 2020 [citado 19/05/2022]. Disponible en: <https://www.aacc.org/advocacy-and-outreach/global-lab-quality-initiative/webinars-en-espanol/2020/intervalos-de-referencia>

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

AARM: conceptualización, curación de datos, análisis formal, investigación, metodología, administración del proyecto, recursos, supervisión, validación, visualización, diseño, conducción y ejecución de todos los ensayos bioquímicos referidos en el estudio, redacción del borrador original, redacción (revisión y edición).

LGM: conceptualización, curación de datos, análisis formal, investigación, metodología, administración del proyecto, recursos, supervisión, validación, visualización, ejecución de los ensayos bioquímicos del estudio, redacción del borrador original, redacción (revisión y edición).

ECC, IDAF: análisis formal, investigación, metodología, ejecución de los ensayos bioquímicos del estudio.

JRVU: análisis formal, investigación, metodología.