



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Validación del procedimiento de detección y confirmación de la presencia de eritropoyetina recombinante, biosimilares y sustancias análogas en suero y orina humana realizado mediante la técnica de Western Blot con SDS-PAGE”

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

Alejandro Morales Aparicio

ASESORES:

**Dr. Benjamín Velasco Bejarano
Dra. Marycarmen Godínez Victoria**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Esta tesis fue desarrollada en el Laboratorio Nacional de Prevención y Control del Dopaje de la CONADE, así como en el laboratorio L-122 de la sección de Química Orgánica del Departamento de Ciencias Químicas de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1 UNAM.



◆ **DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS**

Dedico la realización de este trabajo a mis padres: a mi mamá Isabel Aparicio y a mi papá Alejandro Gustavo Morales León, a quienes también les extiendo el principal agradecimiento, ya que debido al amor, paciencia, educación y a un sin número de valores que me brindaron y cimentaron en mí, pude construir una formación personal que me ha llevado a conseguir logros y superar objetivos.

Agradezco a toda mi familia, a mi hermano Rodrigo Morales Aparicio, a mi tía Feliciano Aparicio cuyas enseñanzas y consejos han sido un punto clave en mi carácter, a mis primos, tíos y amigos.

Agradezco la dirección de mis asesores, el Dr. Benjamín Velasco Bejarano y la Dra. Marycarmen Godínez Victoria, la capacitación y apoyo que recibí de mis compañeros del Laboratorio Nacional de Prevención y Control del Dopaje, principalmente de mi colega y amiga la Q.F.B. Ana Laura Pérez Pacheco. De igual manera, agradezco a la Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte, CONADE, por permitirme el uso de sus instalaciones.

Finalmente le debo un enorme agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán que me brindaron las herramientas necesarias para desempeñarme profesionalmente y adquirir conocimientos invaluable que hoy me permiten desarrollar mi tesis.



◆ **ÍNDICE**

1. Resumen	10
2. Abstract	10
3. Introducción	11
4. Antecedentes	12
4.1 Laboratorio Nacional de Prevención y Control del Dopaje	12
4.2 Eritropoyetina (EPO)	13
4.3 Detección de EPO como sustancia dopante	15
4.4 Técnica de Western Blot	16
5. Planteamiento del problema	20
6. Hipótesis	20
7. Justificación	20
8. Objetivos	21
8.1 Objetivo General	21
8.2 Objetivos Particulares	21
9. Materiales y método	22
9.1 Sustancias analizables	22
9.2 Controles	22
9.3 Protocolo de validación	22
9.4 Descripción del método	24
9.5 Preparación de soluciones	28
10. Resultados	30
10.1 Límite de detección	30
10.1.1 $rEPO_{\alpha\beta}$	30
10.1.2 NESP	32



10.1.3 CERA	35
10.2 Selectividad/Especificidad	37
10.3 Sensibilidad	41
10.4 Repetibilidad	45
10.5 Contaminación por arrastre	47
10.5.1 Matriz de orina	47
10.5.2 Matriz de suero	48
10.6 Intervalo de trabajo	50
10.7 Reproducibilidad	53
10.8 Rendimiento del proceso de inmunopurificación	68
10.9 Influencia del tipo de transferencia sobre los resultados	73
11. Discusión de Resultados	75
12. Conclusiones	79
13. Referencias bibliográficas	80
14. Anexo 1. Criterios de evaluación de resultados	84
15. Anexo 2. Criterios de aceptación de resultados	85
16. Anexo 3. Ejemplo de un ensayo analizado por el programa GasEPO	86
17. Anexo 4. Preparación de geles para SDS – PAGE	93

◆ **ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS**

TABLAS

4.2.1 Agentes estimuladores de la eritropoyesis (AEEs)	15
4.3.1 Técnicas de detección de EPO en el dopaje	16
9.5.1 Preparación de las disoluciones de $rEPO_{\alpha\beta}$ para la determinación del límite de detección e intervalo de trabajo	28



9.5.2	Preparación de las disoluciones de NESP para la determinación del límite de detección e intervalo de trabajo	29
9.5.3	Preparación de las disoluciones de CERA para la determinación del límite de detección e intervalo de trabajo	29
10.1.1.1	Resultados del análisis de $rEPO_{\alpha\beta}$ a concentración de 0.5 mUI/ μ L	30
10.1.1.2	Resultados del análisis de $rEPO_{\alpha\beta}$ a concentración de 0.75 mUI/ μ L	31
10.1.1.3	Resultados del análisis de $rEPO_{\alpha\beta}$ a concentración de 1 mUI/ μ L	31
10.1.1.4	Resultados del análisis de $rEPO_{\alpha\beta}$ a concentración de 1.5 mUI/ μ L	32
10.1.2.1	Resultados del análisis de NESP a concentración de 1.25 pg/ μ L	33
10.1.2.2	Resultados del análisis de NESP a concentración de 2.5 pg/ μ L	33
10.1.2.3	Resultados del análisis de NESP a concentración de 5 pg/ μ L	34
10.1.2.4	Resultados del análisis de NESP a concentración de 10 pg/ μ L	34
10.1.3.1	Resultados del análisis de CERA a concentración de 0.05 ng/ μ L	35
10.1.3.2	Resultados del análisis de CERA a concentración de 0.08 ng/ μ L	36
10.1.3.3	Resultados del análisis de CERA a concentración de 0.1 ng/ μ L	36
10.1.3.4	Resultados del análisis de CERA a concentración de 0.15 ng/ μ L	37
10.4.1	Determinación de la repetibilidad para $rEPO_{\alpha\beta}$ a concentración de 0.75 mUI/ μ L	45
10.4.2	Determinación de la repetibilidad para $rEPO_{\alpha\beta}$ a concentración de 1.5 mUI/ μ L	45
10.4.3	Determinación de la repetibilidad para NESP a concentración de 2.5 pg/ μ L	45
10.4.4	Determinación de la repetibilidad para NESP a concentración de 10 pg/ μ L	46
10.4.5	Determinación de la repetibilidad para CERA a concentración de 0.08 ng/ μ L	46
10.4.6	Determinación de la repetibilidad para CERA a concentración de 0.15 ng/ μ L	46
10.5.1	Resultados de contaminación por arrastre en matriz de orina	47
10.5.2	Resultados de contaminación por arrastre en matriz de suero	48
10.7.1	Concentración de cada analito analizado	53
10.7.2	Determinación de la reproducibilidad para $rEPO_{\alpha\beta}$ a concentración de 0.5 mUI/ μ L	56



10.7.3	Determinación de la reproducibilidad para rEPO _{αβ} a concentración de 0.75 mUI/μL	57
10.7.4	Determinación de la reproducibilidad para rEPO _{αβ} a concentración de 1 mUI/μL.	58
10.7.5	Determinación de la reproducibilidad para rEPO _{αβ} a concentración de 1.5 mUI/μL	59
10.7.6	Determinación de la reproducibilidad para NESP a concentración de 1.25 pg/μL	60
10.7.7	Determinación de la reproducibilidad para NESP a concentración de 2.5 pg/μL	61
10.7.8	Determinación de la reproducibilidad para NESP a concentración de 5 pg/μL	62
10.7.9	Determinación de la reproducibilidad para NESP a concentración de 10 pg/μL	63
10.7.10	Determinación de la reproducibilidad para CERA a concentración de 0.05 ng/μL	64
10.7.11	Determinación de la reproducibilidad para CERA a concentración de 0.08 ng/μL	65
10.7.12	Determinación de la reproducibilidad para CERA a concentración de 0.1 ng/μL	66
10.7.13	Determinación de la reproducibilidad para CERA a concentración de 0.15 ng/μL	67
10.8.1	Distribución de muestras en el gel para evaluar el rendimiento del proceso de inmunopurificación	68
10.8.2	Determinación del rendimiento del proceso de inmunopurificación para rEPO _{αβ}	69
10.8.3	Determinación del rendimiento del proceso de inmunopurificación para NESP	70
10.8.4	Determinación del rendimiento del proceso de inmunopurificación para CERA	71

FIGURAS

4.2.1	Estructura primaria y secundaria de la EPO	14
4.4.1	Tipos de uniones entre antígeno y anticuerpo	18
4.4.2	Inmunodetección y revelado	19
7.1	Estadística del uso de EPO	21
9.3.1	Esquema del orden a seguir en la transferencia	26
10.2.1	Ensayo de selectividad/especificidad para rEPO _{αβ}	38
10.2.2	Ensayo de selectividad/especificidad para NESP	39
10.2.3	Ensayo de selectividad/especificidad para CERA	40



10.3.1	Ensayo de sensibilidad para rEPO _{αβ}	41
10.3.2	Ensayo de sensibilidad para NESP	42
10.3.3	Ensayo de sensibilidad para CERA	43
10.3.4	Gráficas del comportamiento de la sensibilidad para rEPO _{αβ} , NESP y CERA	44
10.5.1	Análisis por Gas EPO de la membrana correspondiente al ensayo de contaminación por arrastre en matriz de orina	48
10.5.2	Análisis por Gas EPO de la membrana correspondiente al ensayo de contaminación por arrastre en matriz de suero	49
10.6.1	Determinación del Intervalo de trabajo para rEPO _{αβ}	50
10.6.2	Determinación del Intervalo de trabajo para NESP	51
10.6.3	Determinación del Intervalo de trabajo para CERA	52
10.7.1	Ensayo de reproducibilidad para la determinación de rEPO _{αβ}	54
10.7.2	Ensayo de reproducibilidad para la determinación de NESP	55
10.7.3	Ensayo de reproducibilidad para la determinación de CERA	55
10.8.1	Análisis por Gas EPO de la membrana correspondiente al ensayo de rendimiento del proceso de inmunopurificación para rEPO _{αβ}	69
10.8.2	Análisis por Gas EPO de la membrana correspondiente al ensayo de rendimiento del proceso de inmunopurificación para NESP	70
10.8.3	Análisis por Gas EPO de la membrana correspondiente al ensayo de rendimiento del proceso de inmunopurificación para CERA	71
10.8.4	Rendimiento del proceso de inmunopurificación en función del volumen de la banda	72
10.8.5	Rendimiento del proceso de inmunopurificación en función del porcentaje	72
10.9.1	rEPO _{αβ} a diferentes concentraciones	73
10.9.2	NESP a diferentes concentraciones	73
10.9.3	CERA a diferentes concentraciones	74



◆ **ABREVIATURAS**

Ac – Anticuerpo

AMA – Agencia Mundial Antidopaje

AEEs – Agentes Estimuladores de la Eritropoyesis

BG – *Background* (ruido de fondo)

BLOR – Muestra de orina control negativo (blanco de orina)

BLOR rEPO/NESP - Muestra de orina control negativo para rEPO_{αβ} y NESP

BND – Banda no detectable

°C – Grados Celsius

CERA – Activador continuo del receptor, Metoxi-polietilenglicolepoetina beta

CI – Control inferior

COMPLETE – Coctel Inhibidor de Proteasas

CONADE – Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte

CS – Control superior

ELISA – Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzimas

EMA – Entidad Mexicana de Acreditación, A.C.

EPO – Eritropoyetina

EPO-Fc – Eritropoyetina Fc

IEF – Isoelectroenfoque

Ig – Inmunoglobulina

IgG – Inmunoglobulina G

IMNC – Instituto Mexicano de Normalización y Certificación

IV – Intravenosa

LNPCD – Laboratorio Nacional de Prevención y control del Dopaje

kDa – Kilodaltones

M – Molar

mA – Miliamperes

mL – Mililitros

mM – Mili molar

MPM – Marcador de peso molecular

mUI – Mili unidades internacionales

NESP – Darbepoetina

ng – Nanogramos



NMX – Norma Mexicana

ORE – Muestra de orina control positivo

ORE rEPO – Muestra de orina control positivo para eritropoyetina recombinante

ORE NESP – Muestra de orina control positivo para darbepoetina

PBS – Buffer de fosfatos pH = 7.4

PBS 1X – Buffer de fosfato salino dilución 1X

PEG – Polietilenglicol

pg – Picogramos

pH – Potencial de hidrógeno

pI – Punto isoeléctrico

PVDF – Fluoruro de polivinilideno

rEPO_{αβ} – Eritropoyetina recombinante α y β

rpm – Revoluciones por minuto

SAR-PAGE – Electroforesis en geles de poliacrilamida con n-lauroilsarcosina de sodio

SDS – Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE – Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

TA – Temperatura ambiente

Tris – Trisaminometano

uEPO – Eritropoyetina endógena urinaria

UI – Unidades Internacionales

μ L – Microlitros

V – Volts

WADA-AMA – *World Anti-Doping Agency- Agence Mondiale Antidopage*



1. RESUMEN

Este trabajo de tesis presenta el desarrollo y la validación de la técnica de Western Blot con SDS-PAGE (Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio), la cual permite la detección y confirmación cualitativa de la presencia de rEPO $_{\alpha\beta}$ y de sus biosimilares como NESP en orina humana, así como para la determinación de CERA (Activador Continuo del Receptor) en suero humano, todas ellas pertenecientes al grupo S2 de la Lista de Sustancias Prohibidas de la Agencia Mundial Antidopaje (WADA-AMA). Esta validación se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Prevención y Control del Dopaje de la Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte (CONADE).

Los parámetros que se determinaron fueron: límite de detección, selectividad/especificidad, sensibilidad, repetibilidad, reproducibilidad, contaminación por arrastre, intervalo de trabajo, rendimiento del proceso de inmunopurificación e influencia del tipo de transferencia sobre la calidad de los resultados.

El procedimiento de detección y confirmación de la presencia de eritropoyetina recombinante, biosimilares y sustancias análogas en suero y orina humana realizado mediante la técnica de Western Blot con SDS-PAGE aquí propuesto, es selectivo/específico para identificar rEPO $_{\alpha\beta}$ y NESP en orina humana y CERA en suero humano; es sensible y reproducible con un amplio intervalo de trabajo.

2. ABSTRACT

This Thesis presents the development and validation of the technique of Western Blot with SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis), for detection and qualitative confirmation of rEPO $_{\alpha\beta}$ and biosimilar substances as NESP, both in human urine, and CERA (Continuous Erythropoietin Receptor Activator) in human serum, all belonging to the group S2 from The Prohibited List of the World Anti-Doping Agency (WADA-AMA). This validation was performed at the Laboratorio Nacional de Prevención y Control del Dopaje of the Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte (CONADE).

The parameters were: detection limit, selectivity / specificity, sensitivity, repeatability, reproducibility, carryover, working range, immunopurification process performance and influence of the kind of transfer on the quality of the results.

The procedure to detection and confirming the presence of recombinant erythropoietin, biosimilars and similar substances in serum and human urine produced through the technique



of Western blot with SDS-PAGE proposed here, is selective / specific for identifying rEPO $_{\alpha\beta}$ and NESP in human urine and CERA in human serum; is sensitive and reproducible with a large working range.

3. INTRODUCCIÓN

La validación es el procedimiento para demostrar que un método analítico es aceptable para el fin que se pretende [Harris, D. C.].

En este trabajo se desarrolló la validación de un procedimiento cualitativo, que por definición es aquel que asegura la presencia o ausencia de uno o más analitos en una muestra, considerando sus propiedades físicas, químicas o biológicas [Harris, D. C.].

Un procedimiento de validación consiste en una verificación de las exigencias específicas que son adecuadas para un uso determinado, es decir, la validación es un conjunto de operaciones requeridas para demostrar que un procedimiento de análisis es adecuado para la aplicación para la que se pretende utilizar.

Un método normalizado es aquel apropiado para el ensayo dentro de su alcance, publicado por organismos de normalización internacional, nacional o regional, o por organizaciones reconocidas en diferentes ámbitos.

El laboratorio debe validar los métodos no normalizados, esto es, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto. La validación debe ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las necesidades del tipo de aplicación o del campo de aplicación específico. El laboratorio debe registrar los datos obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y una declaración sobre la aptitud del método para el uso específico [NMX-EC-17025-IMNC-2006].

En el ámbito del control del dopaje, el laboratorio debe desarrollar, validar y documentar métodos para la detección y confirmación de sustancias presentes en muestras biológicas que están indicadas en la Lista de sustancias prohibidas emitida por la WADA-AMA, así como para metabolitos, marcadores o sustancias similares [ISL 7.0 JANUARY 2015]. Una validación soportada por la WADA-AMA, puede ser empleada como respaldo ante un proceso legal.

Dentro de la validación se deben de considerar algunos parámetros como son:

Límite de detección: el cuál es la concentración más baja a la cual puede detectarse el analito bajo las condiciones experimentales establecidas, inequívocamente del ruido de fondo.



Selectividad/especificidad: es la capacidad de un método analítico para determinar la presencia de un analito dentro de una matriz compleja, sin ser interferido por otros componentes de la matriz.

Sensibilidad: es el cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en la concentración del analito.

Repetibilidad: es la precisión de la medida en condiciones de repetibilidad. Estas condiciones incluyen el mismo procedimiento de medición, mismo analista, el mismo sistema de medida y el mismo lugar, así como mediciones repetidas de la misma muestra.

Reproducibilidad: grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea por dos analistas o instrumentos diferentes, usando el mismo método en diferentes días.

Contaminación por arrastre: es la contaminación analítica relacionada con el analito estudiado por el precedente, debido al arrastre de éste por el sistema analítico.

Intervalo de trabajo: intervalo comprendido entre las concentraciones superior e inferior (incluyendo dichas concentraciones) y para las que se ha demostrado que el analito es cuantificado con un nivel satisfactorio de repetibilidad, recuperación y linealidad.

Rendimiento del proceso de inmunopurificación: es la cantidad de un analito que se recupera después de sufrir el proceso de inmunopurificación.

Influencia del tipo de transferencia sobre la calidad de los resultados: comportamiento de las características de los resultados (densidad, forma, ruido de fondo, etc.) después de sufrir cierto tipo de transferencia.

4. ANTECEDENTES

4.1 Laboratorio Nacional de Prevención y Control del Dopaje-CONADE.

El Laboratorio Nacional de Prevención y Control del Dopaje (LNPCD) de la CONADE tiene el compromiso de generar resultados confiables y oportunos, aplicando procedimientos de ensayo para determinar la presencia y en algunos casos la concentración de sustancias prohibidas, sus metabolitos o marcadores en muestras biológicas de atletas relacionados con el control antidopaje, lo anterior a través de la implementación y reconocimiento de un Sistema de Gestión de la Calidad basado en los requisitos de la Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006 y documentos relacionados con la acreditación ante la Entidad Mexicana de Acreditación,



A.C. (EMA), así como en el “*International Standard for Laboratories*” (ISL 2015) además en los documentos técnicos emitidos por la Agencia Mundial Antidopaje [Política de calidad del LNPCD].

El Sistema de gestión de la Calidad, además, está basado en una filosofía de trabajo que cumple con los principios fundamentales del sistema de acreditación de laboratorios de la WADA-AMA que están descritos en el Código Mundial Antidopaje y abierto a la mejora continua. El laboratorio no puede comprometerse a ninguna actividad que ponga en peligro su integridad e independencia de juicio en lo que se refiere a sus actividades de ensayo. El origen de las muestras de control antidopaje que pueden ser analizadas en el laboratorio viene limitado por el Código Mundial Antidopaje, dirigido específicamente a impedir la realización de análisis no ligados a programas oficiales de control antidopaje [Política de calidad del LNPCD].

El 9 de noviembre del 2012, el LNPCD fue acreditado por la EMA como un laboratorio que cumple con los requisitos de competencia técnica con base en la Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006, así como en los requisitos de sistema de gestión necesarios para entregar resultados de ensayos técnicamente válidos. Posteriormente, el 26 de junio del 2013, el LNPCD recibió la acreditación por parte de la WADA-AMA, siendo uno de los 33 laboratorios acreditados a nivel mundial.

4.2 Eritropoyetina.

La Eritropoyetina (EPO) es una glicoproteína plasmática que estimula la eritropoyesis y actúa además sobre otras células de la sangre y sobre otros tejidos como el cerebro y el miocardio [Fuentes, A.].

La molécula de EPO está compuesta por una porción proteica de 165 aminoácidos y por una estructura de hidratos de carbono que constituye del 35 al 40% de la molécula. El papel de estos hidratos de carbono es mejorar la estabilidad de la molécula y prolongar su vida media. La EPO tiene un peso molecular de 30 kDa. La estructura terciaria se compone de cuatro α -hélices antiparalelas, con dos puentes disulfuro que se establecen entre cuatro cisteínas (Figura 4.2.1) [Alegre, A.].

La principal función de la EPO es mantener el número de eritrocitos y la concentración normal de la hemoglobina en la sangre y recuperar los valores después de una hemorragia. Así mismo, estimula la proliferación de las células progenitoras eritroides e impulsa la ontogenia del eritrocito desde el progenitor mieloeritroide hasta el eritrocito maduro [Parham, P.]. El riñón sintetiza y segrega EPO en respuesta a la disminución de tensión de oxígeno en los tejidos. Existe un mecanismo de retro regulación de modo que, cuando se produce una mayor

oxigenación de los tejidos, se frena la síntesis de EPO. El exceso de EPO provoca el aumento del número de eritrocitos, elevando así el contenido de oxígeno en sangre y en consecuencia, el transporte de O₂ a los tejidos [Jelkmann, W. E.].

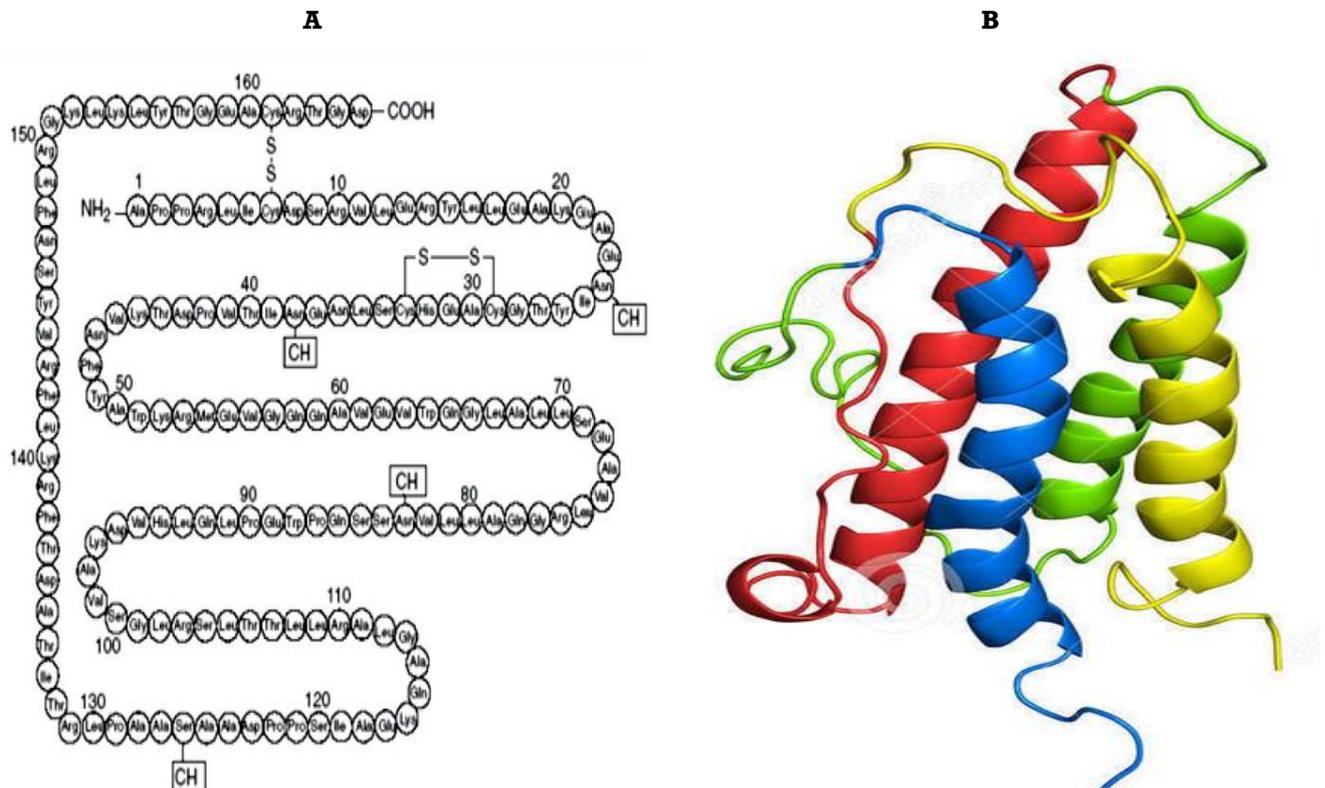


Figura 4.2.1 Estructura primaria (A) y secundaria (B) de la EPO [Peñuela, O.]

Actualmente se dispone de diferentes tipos de EPO recombinante (rEPO) para el tratamiento de anemias de diferente etiología, entre ellas se enuncia la rEPO α , β , δ y ω (Tabla 4.2.1) [Cabrera, L.]. Asimismo se dispone de preparados comercializados de acción prolongada, como la darbepoetina alfa (NESP, novel erythropoiesis stimulating protein; nueva proteína estimulante de la eritropoyesis) y la eritropoyetina beta pegilada denominada CERA (Activador Continuo del Receptor/ Continuous Erythropoietin Receptor Activator). NESP es un análogo hiperglicosilado de la EPO que presenta distintas propiedades físicoquímicas y biológicas [Pascual, J.A.]. Al igual que NESP, la CERA tiene una vida media circulante muy prolongada y es posible espaciar las dosis significativamente para obtener un control satisfactorio de la anemia en enfermos renales [Buemi, M.].

Tabla 4.2.1 Agentes estimuladores de la eritropoyesis (AEEs) [Neumayer, H.]

Tipo	Nombre	Peso Molecular	Tiempo de vida media
rhuEPO (eritropoyetina humana recombinante)	Epoetina alfa (Ej. Eprex)	30 kDa	4 - 11 horas (IV)
	Epoetina beta (Ej. Neorecormon)	30 kDa	12 horas (IV)
	Epoetina delta (Ej. Dynepo)	30 kDa	27 horas (IV)
	Epoetina omega (Ej. Hemax)	35 kDa	13 horas (IV)
Agentes estimuladores de la eritropoyesis de acción prolongada	Darbepoetina alfa (NESP; Ej. Aranesp)	38 kDa	18 - 25 horas (IV)
	Eritropoyetina pegilada (CERA; Ej. Mircera)	60 kDa	95 horas (IV)
Otros AEEs	Péptido sintético pegilado (Ej. Hematide)	4 - 5 kDa	40 horas (IV)

4.3 Detección de EPO como sustancia dopante.

La detección de la administración de EPO es un reto difícil, para lograrlo se conocen dos estrategias: la detección indirecta y la detección directa de EPO en orina. Para la detección indirecta existen diversos métodos. Uno de ellos consiste en la medición de diferentes parámetros hematológicos que se pueden alterar tras la administración de EPO [Parisotto et al, 2000], otro se basa en la medición de la concentración de EPO que posee una población de individuos en común, de manera que un intervalo normal puede ser establecido y se usa para identificar las muestras “sospechosas”. Desafortunadamente, muchas veces los valores de una población muestran una variabilidad muy amplia, de igual manera, los valores de EPO de una población son difíciles de establecer debido a muchos factores que afectan la concentración de EPO de un individuo. La detección directa de EPO en orina está basada en las diferencias que posee la composición de carbohidratos de la molécula de EPO endógena, en comparación con la molécula de rEPO, esto da como resultado un cambio en la carga total de la molécula a un cierto valor de pH [Lasne, F.]. Estas diferencias pueden ser detectadas mediante el empleo de técnicas electroforéticas, donde las proteínas se van a separar al ser sometidas a un campo eléctrico. Dentro de las técnicas electroforéticas empleadas para la detección de EPO podemos encontrar las siguientes:



- Isoelectroenfoque (IEF). Las muestras de orina se someten a una migración electroforética en un gel que contiene un gradiente de pH. Las proteínas migran hasta alinearse (enfoque) en la zona de gradiente de pH correspondiente a su punto isoeléctrico (pI) [Lasne, F.].
- Técnica de Western Blot con SDS-PAGE. Consiste en separar moléculas disueltas en una mezcla bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado, en función de su peso molecular. La adición de dodecil sulfato de sodio (SDS) en el gel, permite que las proteínas adquieran una carga negativa en proporción a su masa [Westermeier, R.].
- Técnica de Western Blot con SAR-PAGE. Posee el mismo fundamento que SDS-PAGE, con la diferencia de que en lugar de SDS, se va a agregar n-lauroilsarcosina de sodio (SAR) al gel. SAR es un agente tensoactivo aniónico que se une específicamente a la parte proteica de CERA ignorando las cadenas de polietilenglicol (PEG) que posee, mientras que SDS reconoce ambas zonas [Reichel, C.].

En la tabla 4.3.1 se presentan las recomendaciones por parte de la WADA-AMA para la elección del método más adecuado para la detección de EPO.

Tabla 4.3.1 Técnicas de detección de EPO en el dopaje [WADA, Technical Document – TD2014EPO]

Procedimiento de análisis inicial (detección)		Procedimiento de confirmación
Método	Analito	Método
IEF y/o SAR-PAGE	rEPO	SDS-PAGE o SAR-PAGE
	NESP	IEF or SDS-PAGE o SAR-PAGE
	CERA	IEF o SAR-PAGE
SAR-PAGE	EPO-Fc	SDS-PAGE o SAR-PAGE
SDS-PAGE o SAR-PAGE	Peginesatide	SDS-PAGE o SAR-PAGE

4.4 Técnica de Western Blot con SDS-PAGE.

Western Blot es una técnica analítica ampliamente utilizada para el estudio de las proteínas. Consta de las siguientes fases: electroforesis en gel, transferencia, inmunodetección y revelado.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). SDS-PAGE es el acrónimo en inglés de “*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*” (Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio) [WADA. Technical Document –

TD2014EPO]. Este tipo de electroforesis consiste en separar moléculas disueltas en una mezcla bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado, en función de su peso molecular. La adición de SDS en el gel, permite que las proteínas adquieran una carga negativa en proporción a su masa. Esta característica permite diferenciar una mezcla de proteínas, ya que se considera que la distancia de migración de éstas en el gel está determinada por el tamaño de la estructura proteica desplegada, es decir, la longitud de su cadena, número de aminoácidos o masa molecular [Westermeier, R.]. El SDS es un detergente de acción desnaturizante que se une a las cadenas polipeptídicas con una relación de 1.4 gramos de SDS por gramo de proteína, uniéndose aproximadamente una molécula de SDS por cada dos aminoácidos de la cadena. Esta unión masiva de moléculas de SDS bloquea la carga propia de la molécula de proteína y le confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa, haciendo que todas las proteínas acomplejadas con SDS viajen hacia el ánodo. La separación de los complejos SDS-proteína es proporcional sólo a la masa de la proteína pues todas tienen la misma carga por unidad de masa. [Westermeier, R.]

Transferencia. Consiste en el paso de una proteína desde un soporte (por ejemplo, el gel) a otro (por ejemplo, membrana de fluoruro de polivinilideno, PVDF) por la influencia de un campo eléctrico. Una vez finalizada la transferencia, se realiza un bloqueo con el fin de evitar las uniones inespecíficas sobre las membranas, saturando su superficie con otras proteínas (Ej. Proteínas de la leche).

Inmunodetección. Para dar fundamento a este paso, a continuación se define la reacción antígeno – anticuerpo.

El concepto “llave – cerradura” ha acompañado a la reacción antígeno – anticuerpo. Esta unión compromete varios aspectos, tales como las estructuras proteicas de las moléculas, las fuerzas de unión (que en su mayoría no son covalentes sino del tipo puentes de hidrógeno), las uniones electrostáticas y las fuerzas de Van Der Waals (Figura 4.4.1). Una de las propiedades características de los anticuerpos es su capacidad de reaccionar específicamente con los antígenos inductores de su producción (antígenos homólogos). La reacción antígeno – anticuerpo ocurre en dos etapas. En la primera sucede la interacción fisicoquímica entre las moléculas del antígeno y el anticuerpo y en la segunda esta interacción se hace manifiesta por la formación de un precipitado, cuando el antígeno es soluble o de un aglutinado, cuando el antígeno es particulado.

En la Inmunodetección ocurren las siguientes fases:

1. Unión de la proteína embebida en la membrana con un anticuerpo (Ac) primario monoclonal anti – EPO, de la clase IgG procedente de ratón. El Ac primario se une al epítipo de la eritropoyetina comprendido entre el aminoácido 99 al 129.
2. Unión de un Ac secundario policlonal anti – IgG de ratón conjugado con biotina.
3. Unión de la estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano que posee una alta afinidad por la biotina unida al Ac secundario.
4. Por último, la adición del sustrato enzimático, H₂O₂ en presencia de luminol.

Revelado. La detección del complejo (anticuerpo primario + secundario + enzima) se realiza mediante la captación de la quimioluminiscencia producida al añadir sobre la enzima su sustrato (H₂O₂) en presencia de luminol. La producción de luz es inmediata y muy sensible (Figura 4.4.2).

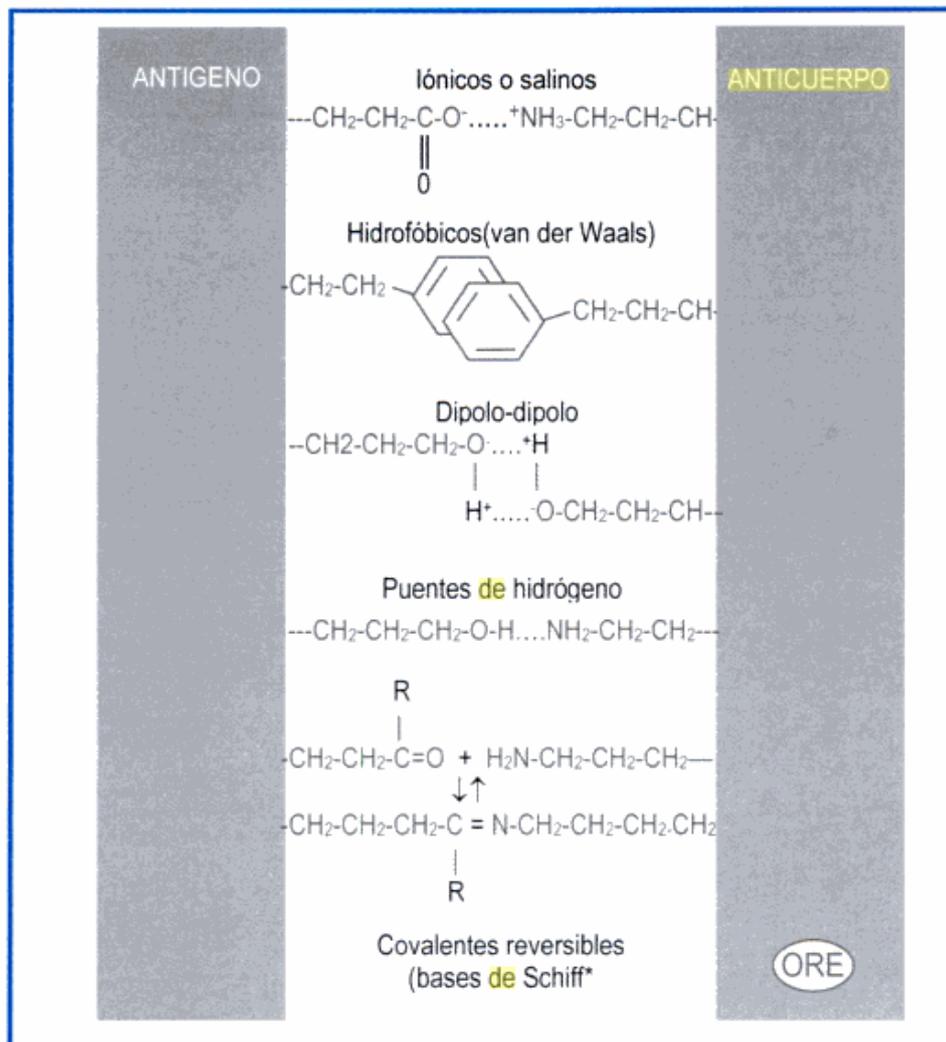


Figura 4.4.1 Tipos de uniones entre antígeno y anticuerpo [Rojas, O.]

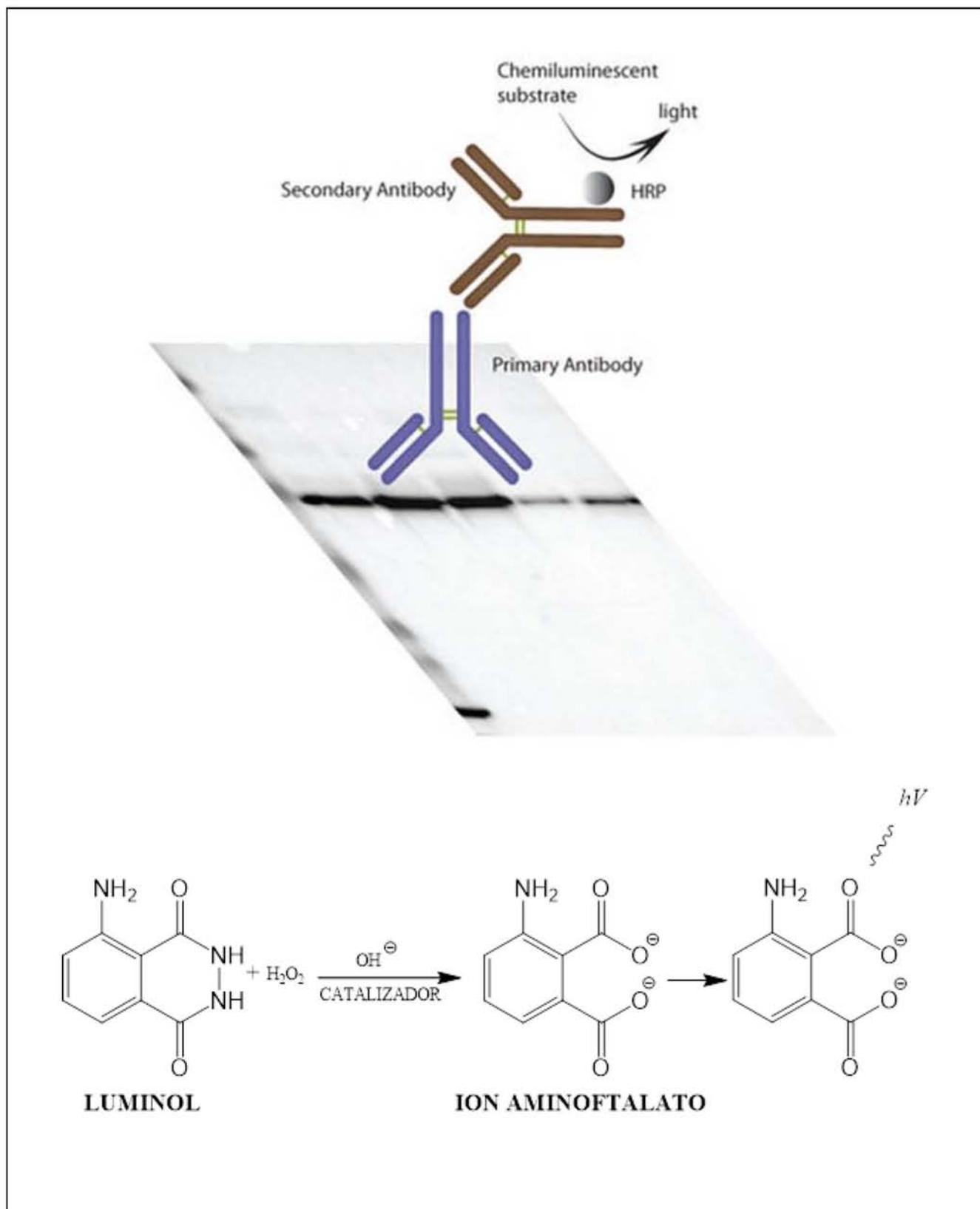


Figura 4.4.2 Inmunodetección y revelado [Sigma Aldrich].



5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El LNPCD de la CONADE mantiene un riguroso sistema de Gestión de la Calidad, el cual está acreditado por la EMA a nivel nacional y por la WADA-AMA a nivel mundial. Lo anterior crea la necesidad de reportar resultados altamente confiables, de lo contrario y ante un resultado falso positivo, el laboratorio será acreedor a diversas sanciones, desde una acción correctiva hasta una suspensión inmediata de la acreditación, más las implicaciones legales con terceros (atleta, federación, etc.)^[WADA, ISL 2015]. La forma de garantizar el buen funcionamiento de los métodos analíticos y la obtención de resultados confiables, es la validación. Por lo que en este trabajo de Tesis se presenta la validación del procedimiento de detección y confirmación de la presencia de eritropoyetina recombinante, biosimilares y sustancias análogas en suero y orina humana realizado mediante la técnica de Western Blot con SDS-PAGE, para que a partir de la obtención de parámetros como son el límite de detección, la selectividad/especificidad, la sensibilidad, la repetibilidad, la reproducibilidad, la contaminación por arrastre, el intervalo de trabajo y el rendimiento del proceso de inmunopurificación, se cumplan los criterios de aceptación de resultados y se permita conocer las limitaciones del método y garantizar que el procedimiento genera resultados confiables.

6. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Si todos los parámetros evaluados cumplen con los criterios de aceptación de la validación, entonces se contará con un método altamente confiable para la detección de rEPO y Biosimilares mediante la Técnica de Western Blot con SDS-PAGE en el LNPCD de la CONADE en muestras de orina y suero procedentes de atletas.

7. JUSTIFICACIÓN

La administración de EPO (EPO exógena) se ha popularizado en la comunidad deportiva, orillando a las autoridades de antidopaje a sancionar a los atletas que hagan uso de esta hormona ^[Leuenberger, N.] En la gráfica 7.1 se presenta los datos de los casos analíticos adversos a EPO reportados por los laboratorios acreditados y que desde el año 2003 hasta el 2014 ha informado la WADA-AMA en su página electrónica. Debido a esto, el Laboratorio Nacional de Prevención y Control del Dopaje-CONADE, al estar acreditado, debe contar con procedimientos para la detección y confirmación de la presencia de rEPO y sustancias análogas

en suero y orina de muestras de control antidopaje y estos resultados deben de adecuados y confiables.



Figura 7.1 Número de casos positivos por la presencia de EPO [WADA, Statistics].

8. OBJETIVOS

8.1 Objetivo General

Validar el procedimiento de detección y confirmación de la presencia de eritropoyetina recombinante, biosimilares y sustancias análogas en suero y orina humana realizado mediante la técnica de Western Blot con SDS-PAGE, para demostrar que los resultados obtenidos son confiables y que el procedimiento es adecuado para la confirmación de casos sospechosos de dopaje, dentro del LNPCD de la CONADE, acorde a los documentos técnicos de la WADA-AMA.

8.2 Objetivo Particular

Validar la técnica mediante la determinación de los siguientes parámetros:

- Límite de detección
- Selectividad/Especificidad
- Sensibilidad
- Repetibilidad
- Reproducibilidad
- Contaminación por arrastre



- Intervalo de trabajo
- Rendimiento del proceso de inmunopurificación
- Evaluar la influencia del tipo de transferencia sobre la calidad de los resultados.

9. MATERIALES Y MÉTODO

9.1 Sustancias analizables:

- Darbepoetina α (NESP), presentación comercial, Darbepoetina alfa Aranesp.
- Eritropoyetina recombinante α/β (rEPO $_{\alpha\beta}$), presentación comercial, Eritropoyetina recombinante BRP.
- Metoxi-polietilenglicolepoetina beta (CERA), presentación comercial, Mircera.

9.2 Controles:

1) Controles positivos

- Muestra de orina control positiva de rEPO $_{\alpha\beta}$ (ORE rEPO) y NESP (ORE NESP).
- Suero fortificado con CERA a concentraciones conocidas (suero positivo).
- Disoluciones de rEPO $_{\alpha\beta}$, NESP y CERA en matriz de agua a diferentes concentraciones.

2) Controles negativos

- Orina control negativo (BLOR rEPO/NESP).
- Suero humano negativo para CERA.
- Agua calidad Milli-Q.

3) Marcador de peso molecular

- ColorBurst Electrophoresis Marker. Sigma.

9.3 Protocolo de validación

Límite de detección

El límite de detección se determinó analizando al menos 3 alícuotas de las disoluciones de los analitos de interés a diferentes concentraciones (para rEPO $_{\alpha\beta}$ se analizaron las siguientes concentraciones 0.5, 0.75, 1.0 y 1.5 mUI/ μ L; para NESP se analizaron las siguientes concentraciones: 1.25, 2.5, 5 y 10 pg/ μ L y para CERA se analizaron las siguientes



concentraciones: 0.05, 0.08, 0.1 y 0.15 ng/ μ L). Todas las concentraciones se analizaron mínimo por triplicado en al menos 3 ensayos independientes entre sí.

Selectividad/Especificidad

Para determinar la selectividad/especificidad se realizaron 3 ensayos donde se analizaron las siguientes muestras:

Ensayo 1 (rEPO $_{\alpha\beta}$): 4 muestras control positivas (ORE rEPO) y 4 muestras negativas (BLOR rEPO/NESP).

Ensayo 2 (NESP): 4 muestras control positivas (ORE NESP) y 4 muestras control negativas (BLOR rEPO/NESP).

Ensayo 3 (CERA): 4 muestras de suero positivas para CERA y 4 muestras de suero negativas para la misma sustancia.

Sensibilidad

Para conocer si el procedimiento es sensible para la determinación de rEPO, NESP y CERA, se analizaron diferentes concentraciones (para rEPO $_{\alpha\beta}$ se analizaron las concentraciones de 1.0, 1.25 y 1.5 mUI/ μ L; para NESP se analizaron las concentraciones de 1.25, 2.5 y 5 pg/ μ L y para CERA se analizaron las concentraciones de 0.05, 0.08 y 0.1 ng/ μ L) en un mismo gel para cada analito.

Repetibilidad

La repetibilidad se determinó analizando al menos 3 alícuotas de concentración correspondientes al control inferior (CI) y 3 alícuotas de concentración correspondientes al control superior (CS) del límite de detección de cada analito de interés detectado previamente. Esta serie de ensayos las realizó un solo analista.

Reproducibilidad

La reproducibilidad se determinó analizando al menos 2 alícuotas de al menos 3 concentraciones de cada analito de interés en al menos 2 ensayos independientes entre sí. Todos los ensayos se realizaron por 3 analistas diferentes.

Contaminación por arrastre

Para determinar la contaminación por arrastre en orina, se analizaron de manera intercalada 5 muestras de control positivo para rEPO $_{\alpha\beta}$, NESP y 5 muestras de control negativo para



rEPO/NESP. Para determinar la contaminación por arrastre en suero, se analizaron de manera intercalada 5 muestras diferentes de control positivo para CERA y 5 muestras de control negativo para este analito.

Intervalo de trabajo

Para conocer el intervalo de trabajo se analizaron concentraciones altas y bajas de las disoluciones de rEPO_{αβ}, NESP y CERA.

Rendimiento del proceso de inmunopurificación

Para determinar el rendimiento del proceso de inmunopurificación se analizaron 4 muestras de orina/suero fortificadas con el analito de interés previamente al proceso de inmunopurificación (Inmunopurificadas), y 4 disoluciones del estándar para cada analito (no inmunopurificadas), todas ellas a la misma concentración.

9.4 Descripción del método: “Procedimiento de detección y confirmación de la presencia de eritropoyetina recombinante, biosimilares y sustancias análogas en suero y orina humana realizado mediante la técnica de Western Blot con SDS-PAGE”

Condiciones pre-analíticas de las muestras

Las muestras de orina a analizar deben en lo posible estar a una temperatura no superior a 9 °C, en caso de estar congeladas, deben descongelarse antes de su uso o sumergirlas en un baño de agua a una temperatura no mayor de 25 °C.

El volumen de orina a usar normalmente será de 20 mL.

Procedimiento General

I. Concentración de las muestras de orina

La orina se concentra por filtración a través de filtros que retienen moléculas de masa molar superior a 30 KDa.

1. Adicionar 400 µL de COMPLETE (Coctel de inhibidores de proteasas) a la muestra de orina.
2. Adicionar Tris-HCl 3.75 M, pH 7.4.
3. Comprobar el pH, entre 6.5 y 8.5.
4. Centrifugar a 3000 ± 50 g durante 10 minutos a 20 ± 5 °C.



5. Filtrar el sobrenadante en un tubo de Steriflip.
6. Filtrar la orina con un filtro Amicon ultra-15.
7. Agregar 15 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 y 300 μ L de la disolución de COMPLETE al filtro Amicon ultra-15.
8. Centrifugar de nuevo bajo las condiciones anteriores. Descartar el filtrado y recolectar el volumen de muestra ultra concentrado.
9. Filtrar la orina con un filtro Amicon ultra-4.
10. Transferir el retentato a un microtubo.

II. Concentración de muestras de suero o plasma para la determinación de CERA

1. Transferir de 200 μ L de suero o plasma a un microtubo.
2. Agregar 200 μ L de agua calidad Milli-Q.
3. Agregar 400 μ L de acetonitrilo.
4. Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 minutos a 15 °C.
5. Filtrar el suero con un filtro Amicon ultra-4.
6. Transferir el retentato a un microtubo.

III. Inmunopurificación

Con ayuda de la reacción antígeno-anticuerpo, se reconocen las proteínas presentes en una muestra para aislarlas de otras moléculas que podrían ser interferentes.

La inmunopurificación se llevará a cabo a partir del retentato de las muestras y de los controles. En caso de haber sido congelados los retentatos, esperar a que se descongelen.

1. Cortar el número de pozos necesarios de la placa de ELISA que conforma el kit de ELISA para la determinación de EPO (Stem cell ELISA Kit).
2. Agregar a cada pozo, 25 μ L de la disolución PBS 1X y todo el retentato.
3. Tapar cada pozo con parafilm e incubar a 37 °C en agitación (600-800 rpm) en el Termomezclador, durante 2 horas o toda la noche en refrigeración.
4. Preparar el buffer de elusión.
5. Lavar cada pozo con 400 μ L de PBS 1X
6. Agregar a cada pozo 20 μ L del buffer de elusión e incubar los pozos sin tapar a 95 °C en agitación (1100 rpm) durante 5 minutos.

7. Agregar 10 μL de agua calidad Milli-Q y cargar 20 μL de cada muestra en el gel previamente preparado (ANEXO 4).

IV. Electroforesis en geles de SDS-PAGE

1. Colocar el gel en el módulo de electroforesis.
2. Llenar por las paredes la cámara interna con buffer de electroforesis para SDS-PAGE.
3. Llenar la cámara externa con buffer de transferencia de SDS-PAGE.
4. Colocar el marcador de peso molecular (7 μL), las disoluciones control (20 μL), los controles positivos y negativos y, las muestras (20 μL) en su respectivo pozo.
5. Condiciones de electroforesis: 110V constantes, durante 90 minutos.

V. Inmunodetección

Transferencia

1. Cortar 2 grupos de papel de transferencia por gel.
2. Cortar la membrana de Immobilon P y la de Durapore.
3. Permeabilizar la membrana de Immobilon P con metanol.
4. Lavar la membrana de Immobilon P con agua.
5. Transferir la membrana a una bandeja con buffer de transferencia para SDS-PAGE, y colocar encima del Immobilon P, la membrana de Durapore.
6. Una vez finalizada la electroforesis, retirar el gel.
7. Incubar el gel con buffer de transferencia para SDS-PAGE.
8. Permeabilizar los grupos de papel de transferencia con buffer de transferencia para SDS-PAGE.
9. Armar el cassette de transferencia de acuerdo al siguiente esquema (Figura 9.3.1):

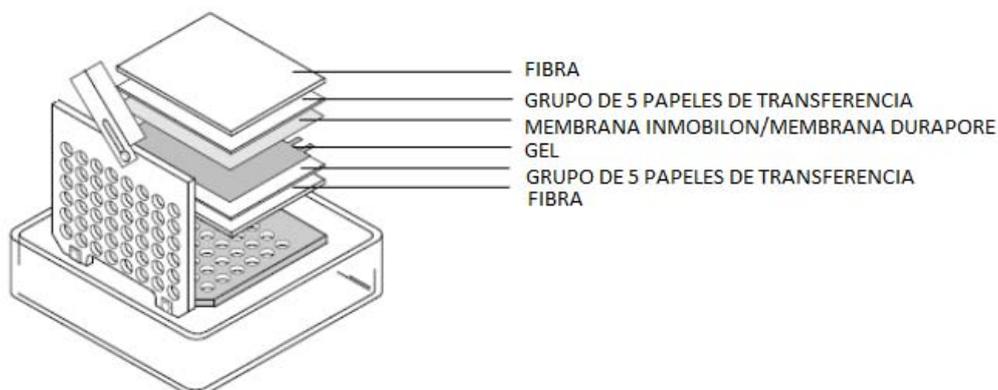


Figura 9.3.1 Esquema del orden a seguir en la transferencia [BIO-RAD. Instruction Manual].



10. Introducir el cassette en el modulo de transferencia.
11. Llenar el tanque con el buffer de transferencia para SDS-PAGE.
12. Condiciones de transferencia: **110 V constante, 350 mA máx., durante 45 minutos.**
13. Al concluir la transferencia, desmontar el sistema y recuperar la membrana de Immobilon P.
14. Lavar la membrana con PBS 1X.
15. Bloquear la membrana con una disolución de leche al 5 % (Svelty 0 % grasa) durante 45 minutos a temperatura ambiente en agitación.
16. Lavar la membrana con PBS 1X.
17. Incubar la membrana con el Anticuerpo primario (Ac primario monoclonal anti – EPO) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación.
18. Lavar la membrana con una disolución de leche al 0.5% durante 10 minutos, 3 veces.
19. Incubar la membrana con el Anticuerpo secundario (Ac secundario policlonal anti IgG) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación.
20. Lavar la membrana con una disolución de leche al 0.5% durante 10 minutos, 3 veces.
21. Incubar la membrana con estreptavidina-peroxidasa durante 40 minutos a temperatura ambiente en agitación.
22. Lavar la membrana con PBS 1X durante 10 minutos, 3 veces.

Detección por quimioluminiscencia

Para la detección se empleó una cámara de captación de quimioluminiscencia ImageQuant LAS 4000.

1. Preparar el reactivo de quimioluminiscencia.
2. Saturar la membrana con el reactivo (adicionar aproximadamente 1 mL de reactivo).
3. Colocar la membrana saturada en la cámara de quimioluminiscencia.
4. Realizar la captura de la imagen a diferentes tiempos de exposición (por ejemplo: 5, 10, 15, 30 segundos).
5. Realizar el análisis de las imágenes por medio del uso de un programa especializado llamado GasEPO Versión V2.1.2, éste proporciona valores de densidad de banda en absorbancia.



9.5 Preparación de soluciones

Preparación de la disolución de rEPO_{αβ} a concentración de 10 mUI/μL

Se realizó una dilución 1:100 de la disolución patrón de rEPO_{αβ} a 100 UI/μL, agregando 990 μL de agua calidad milli-Q a un microtubo y 10 μL de la disolución patrón de rEPO_{αβ} a 100 UI/μL. Esta disolución resultó tener una concentración de 1 UI/μL (1000 mUI/μL).

Se realizó una segunda dilución 1:100, agregando 990 μL de agua calidad milli-Q a un microtubo y 10 μL de la disolución anterior de rEPO_{αβ} a 1 UI/μL (1000 mUI/μL). Esta disolución resultó tener una concentración de 10 mUI/μL (10000 mUI/mL) y fue utilizada para la preparación de las disoluciones empleadas en la determinación del límite de detección.

Tabla 9.5.1 Preparación de las disoluciones de rEPO_{αβ} para la determinación del límite de detección e intervalo de trabajo.

Concentración final (mUI/μL)	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50	2.00	2.50	3.00
Vol. de sol. rEPO _{αβ} 10 mUI/μL (μl)	5.00	7.50	10.00	12.50	15.00	20.00	25.00	30.00
NuPAGE LDS Sample buffer 4X (μL)	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
NuPAGE Sample Reducing Agent 10X (μL)	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Vol. Agua Milli-Q (μL)	60.00	57.50	55.00	52.50	50.00	45.00	40.00	35.00
Vol. Final (μL)	100	100	100	100	100	100	100	100

Preparación de la disolución de NESP a concentración de 40 pg/μL

Se realizó una dilución 1:100 de la disolución patrón de 40 ng/μL, agregando 990 μL de agua calidad milli-Q a un microtubo y 10 μL de la disolución patrón de NESP a 40 ng/μL. Esta disolución resultó tener una concentración de 400 pg/μL.

Se realizó una segunda dilución 1:10, agregando 90 μL de agua calidad milli-Q a un microtubo y 10 μL de la disolución anterior de NESP a 400 pg/μL. Esta disolución tiene una concentración de 40 pg/μL y fue utilizada para la preparación de las disoluciones empleadas en la determinación del límite de detección.



Tabla 9.5.2 Preparación de las disoluciones de NESP para la determinación del límite de detección e intervalo de trabajo.

Concentración final (pg/ μ L)	1.25	2.50	5.00	10.00	12.50
Vol. de sol. NESP 40 pg/ μ L (μ l)	3.15	6.25	12.50	25.00	31.25
NuPAGE LDS Sample buffer 4X (μ L)	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
NuPAGE Sample Reducing Agent 10X (μ L)	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Vol. Agua Milli-Q (μ L)	61.85	58.75	52.50	40.00	33.75
Vol. Final (μ L)	100	100	100	100	100

Preparación de la disolución de CERA a concentración de 1.7 ng/ μ L

Se realizó una dilución 1:100 de la disolución patrón de CERA a 166.67 ng/ μ L, agregando 990 μ L de agua calidad milli-Q a un microtubo y 10 μ L de la disolución patrón de CERA a 166.67 ng/ μ L. Esta disolución resultó tener una concentración 1.7 ng/ μ L.

Tabla 9.5.3 Preparación de las disoluciones de CERA para la determinación del límite de detección e intervalo de trabajo.

Concentración final (ng/ μ L)	0.05	0.08	0.10	0.15	0.20	0.25
Vol. de sol. Mircera 1.7 ng/ μ L (μ l)	3.00	4.50	6.00	9.00	12.00	15.00
NuPAGE LDS Sample buffer 4X (μ L)	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
NuPAGE Sample Reducing Agent 10X (μ L)	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Vol. Agua Milli-Q (μ L)	62.00	60.50	59.00	56.00	53.00	50.00
Vol. Final (μ L)	100	100	100	100	100	100



10. RESULTADOS

10.1 Límite de detección

El Límite de detección se determinó analizando diferentes concentraciones de rEPO $_{\alpha\beta}$, NESP y CERA, utilizando agua calidad Milli-Q como matriz para eliminar cualquier interferencia. Para cada analito se realizaron 4 ensayos independientes entre sí. Todos los resultados se confirmaron con los ensayos de reproducibilidad (precisión intermedia) (Tablas 10.7.2 a 10.7.13).

10.1.1 Eritropoyetina recombinante alfa y beta (rEPO $_{\alpha\beta}$)

Para la determinación del límite de detección de rEPO $_{\alpha\beta}$ se analizaron las siguientes concentraciones: 0.5, 0.75, 1.0 y 1.5 mUI/ μ L (Tablas 10.1.1.1 a 10.1.1.4).

Tabla 10.1.1.1 Resultados del análisis de rEPO $_{\alpha\beta}$ a concentración de 0.5 mUI/ μ L.

Ensayo	Fecha	Alicuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	11/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
2	16/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
3	18/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
4	16/04/2013	1	No cumple	No cumple	BND
		2	No cumple	No cumple	BND
		3	No cumple	No cumple	BND



Tabla 10.1.1.2 Resultados del análisis de rEPO $_{\alpha\beta}$ a concentración de 0.75 mUI/ μ L.

Ensayo	Fecha	Alícuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	11/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
2	16/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
3	18/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
4	16/04/2013	1	No cumple	No cumple	BND
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo

Tabla 10.1.1.3 Resultados del análisis de rEPO $_{\alpha\beta}$ a concentración de 1 mUI/ μ L.

Ensayo	Fecha	Alícuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	11/01/2013	1	No cumple	No cumple	?
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
2	16/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
3	18/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
4	29/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo



Tabla 10.1.1.4 Resultados del análisis de rEPO $_{\alpha\beta}$ a concentración de 1.5 mUI/ μ L.

Analista	Fecha	Alícuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	11/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
2	16/04/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
3	29/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
4	30/04/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo

El Límite de detección de acuerdo a estos resultados se estableció en la concentración de **0.75 mUI/ μ L de rEPO $_{\alpha\beta}$** .

10.1.2 Darbepoetina alfa (NESP)

Para la determinación del límite de detección de NESP, se analizaron las siguientes concentraciones: 1.25, 2.5, 5 y 10 pg/ μ L (Tablas 10.1.2.1 a 10.1.2.4).



Tabla 10.1.2.1 Resultados del análisis de NESP a concentración de 1.25 pg/μL.

Analista	Fecha	Alícuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	11/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
2	16/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
3	18/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
4	23/04/2013	1	No cumple	No cumple	Elevado BG
		2	No cumple	No cumple	Elevado BG
		3	No cumple	No cumple	Elevado BG

Tabla 10.1.2.2 Resultados del análisis de NESP a concentración de 2.5 pg/μL.

Ensayo	Fecha	Alícuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	11/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
2	16/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
3	18/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
4	12/04/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo



Tabla 10.1.2.3 Resultados del análisis de NESP a concentración de 5 pg/ μ L.

Ensayo	Fecha	Alicuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	11/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
2	16/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
3	18/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
4	28/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo

Tabla 10.1.2.4 Resultados del análisis de NESP a concentración de 10 pg/ μ L.

Ensayo	Fecha	Alicuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	11/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
2	28/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
3	23/04/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
4	29/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo

El límite de detección de acuerdo a estos resultados se estableció en la concentración de **2.5 pg/ μ L de NESP.**



10.1.3 Metoxi-polietilenglicol epoetina beta (CERA)

Para la determinación del límite de detección de CERA, se analizaron las siguientes concentraciones: 0.05, 0.08, 0.1 y 0.15 ng/ μ L (Tablas 10.1.3.1 a 10.1.3.4).

Tabla 10.1.3.1 Resultados del análisis de CERA a concentración de 0.05 ng/ μ L.

Ensayo	Fecha	Alícuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	25/06/2013	1	No cumple	No cumple	BND
		2	No cumple	No cumple	BND
		3	No cumple	No cumple	BND
		4	No cumple	No cumple	BND
2	28/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
		4	Cumple	Cumple	Positivo
3	04/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	No cumple	No cumple	BND
		3	Cumple	Cumple	Positivo
		4	Cumple	Cumple	Positivo
4	25/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
		4	Cumple	Cumple	Positivo



Tabla 10.1.3.2 Resultados del análisis de CERA a concentración de 0.08 ng/μL.

Ensayo	Fecha	Alícuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	25/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
		4	Cumple	Cumple	Positivo
2	28/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
		4	Cumple	Cumple	Positivo
3	04/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
		4	Cumple	Cumple	Positivo
4	25/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
		4	Cumple	Cumple	Positivo

Tabla 10.1.3.3 Resultados del análisis de CERA a concentración de 0.1 ng/μL.

Ensayo	Fecha	Alícuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	07/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
		4	Cumple	Cumple	Positivo
2	25/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
		4	Cumple	Cumple	Positivo
3	28/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
		4	Cumple	Cumple	Positivo
4	25/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
		4	Cumple	Cumple	Positivo



Tabla 10.1.3.4 Resultados del análisis de CERA a concentración de 0.15 ng/ μ L.

Ensayo	Fecha	Alícuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	07/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
		4	Cumple	Cumple	Positivo
2	25/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
		4	Cumple	Cumple	Positivo
3	28/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
		4	Cumple	Cumple	Positivo
4	25/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
		4	Cumple	Cumple	Positivo

El Límite de detección de acuerdo a estos resultados se estableció en la concentración de **0.08 ng/ μ L de CERA.**

10.2 Selectividad/Especificidad

Para la evaluación de la selectividad/especificidad en muestras de orina, se analizaron 4 muestras de orina positivas para rEPO/NESP (ORE rEPO y ORE NESP) y cuatro muestras negativas para rEPO/NESP (BLOR rEPO/NESP). Para la evaluación de la selectividad/especificidad en muestras de suero, se analizaron 4 muestras de suero positivo para CERA (suero positivo) y cuatro muestras de suero negativas para CERA (suero negativo).

La determinación de la selectividad/especificidad para rEPO $_{\alpha\beta}$ se realizó mediante un solo ensayo. Los resultados cumplieron con los criterios de evaluación y aceptación de resultados (Anexos 1 y 2), considerándose que este procedimiento es selectivo/específico para el análisis de rEPO $_{\alpha\beta}$ en orina (Figura 10.2.1).

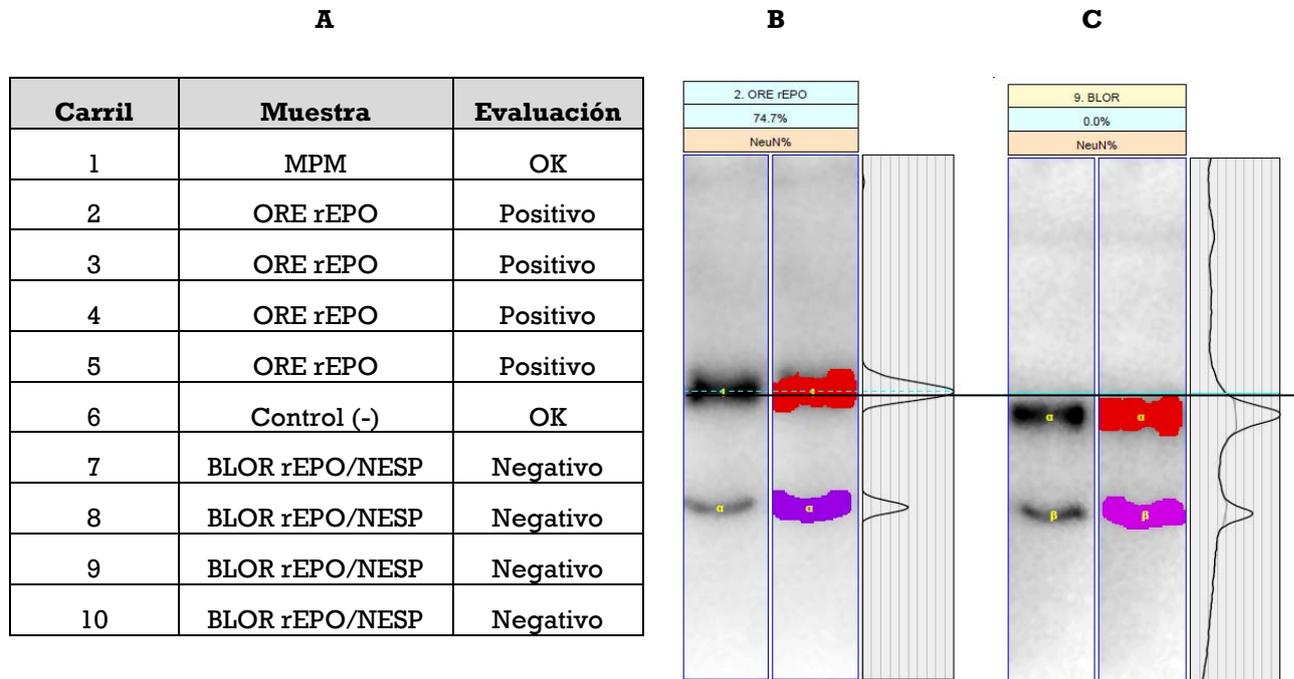


Figura 10.2.1 Ensayo de selectividad/especificidad para rEPO_{αβ}. **A)** Resultados del análisis de la membrana con base en los criterios de evaluación y aceptación (Anexos 1 y 2). **B)** Imagen representativa de las muestras positivas (ORE rEPO) analizadas por el programa GasEPO, la primer banda es la representativa de rEPO, la segunda es una banda inespecífica. **C)** Imagen representativa de las muestras negativas (BLOR rEPO/NESP) analizadas por el programa GasEPO, la primer banda es la representativa de uEPO, la segunda es una banda inespecífica.

10.3 Sensibilidad

La sensibilidad se determinó analizando diferentes concentraciones de NESP, rEPO $_{\alpha\beta}$ y CERA, utilizando agua calidad Milli-Q como matriz.

Para determinar la sensibilidad para rEPO $_{\alpha\beta}$, se analizaron las concentraciones de 1.0, 1.25 y 1.5 mUI/ μ L por triplicado en un mismo gel.

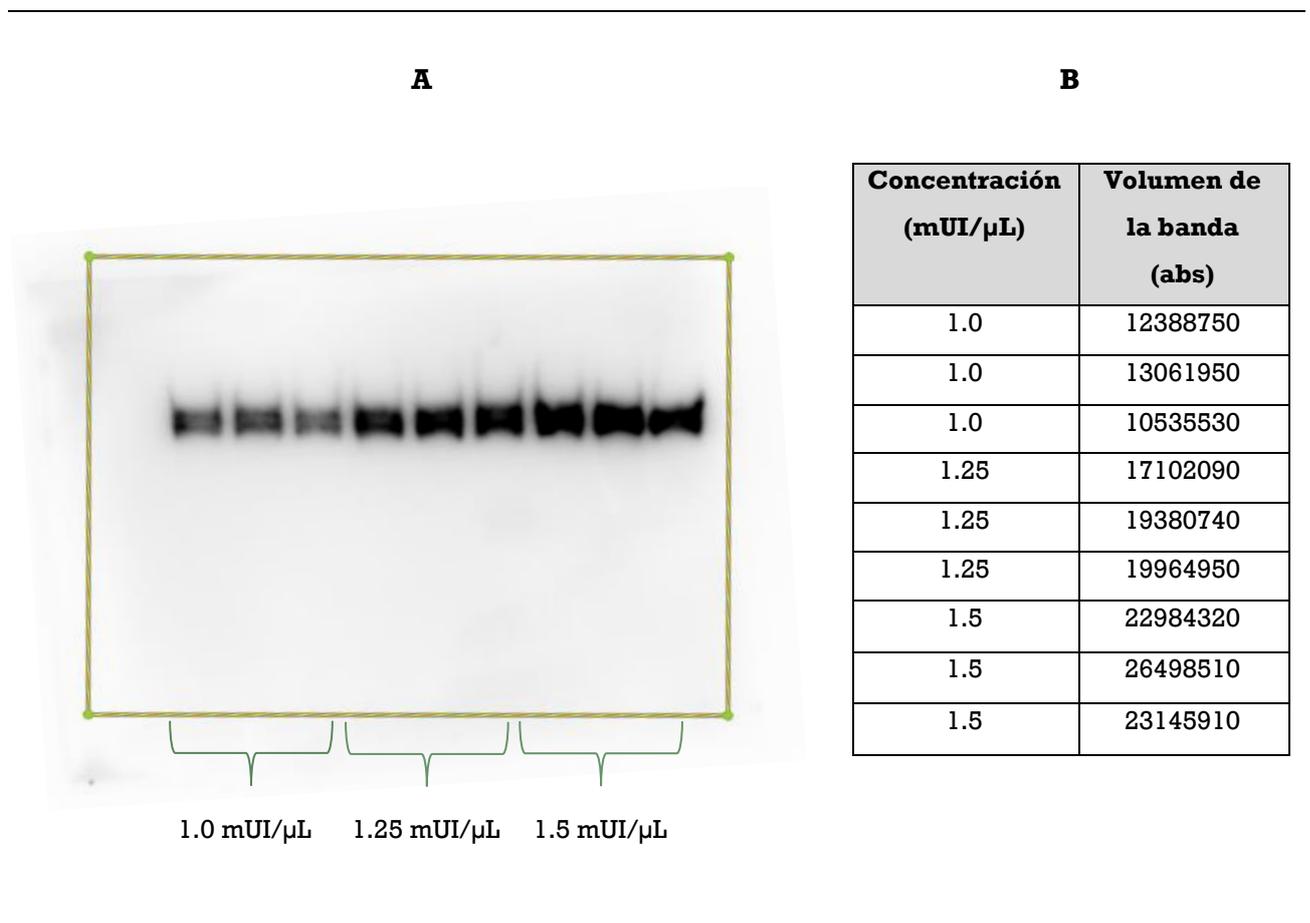


Figura 10.3.1 Ensayo de sensibilidad para rEPO $_{\alpha\beta}$. **A)** Imagen representativa de la membrana. **B)** Resultados del volumen de banda en absorbancia obtenido para cada concentración a través del análisis de la membrana por el programa GasEPO.

Para determinar la sensibilidad para NESP, se analizaron las concentraciones de 1.25, 2.5 y 5 $\text{pg}/\mu\text{L}$ por triplicado en un mismo gel.

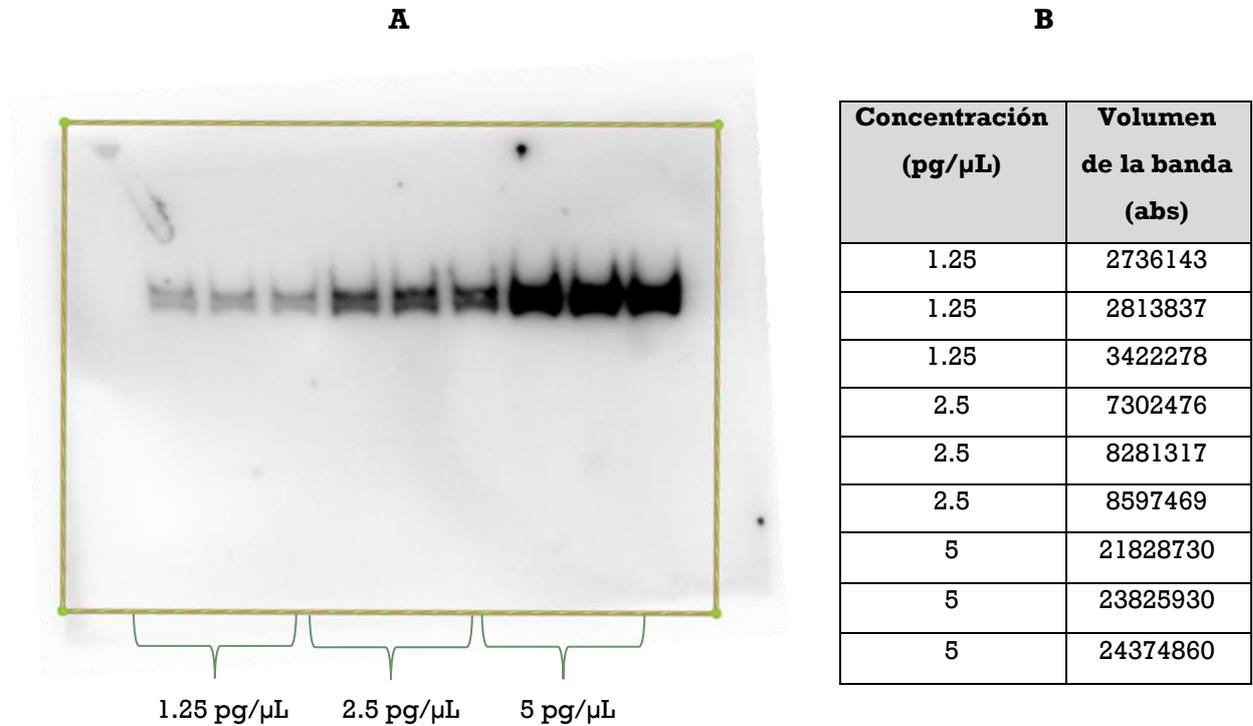


Figura 10.3.2 Ensayo de sensibilidad para NESP. A) Imagen representativa de la membrana. **B)** Resultados del volumen de banda en absorbancia obtenido para cada concentración a través del análisis de la membrana por el programa GasEPO.

Para determinar la sensibilidad para CERA, se analizaron las concentraciones de 0.05, 0.08 y 0.1 ng/ μ L por triplicado en un mismo gel.

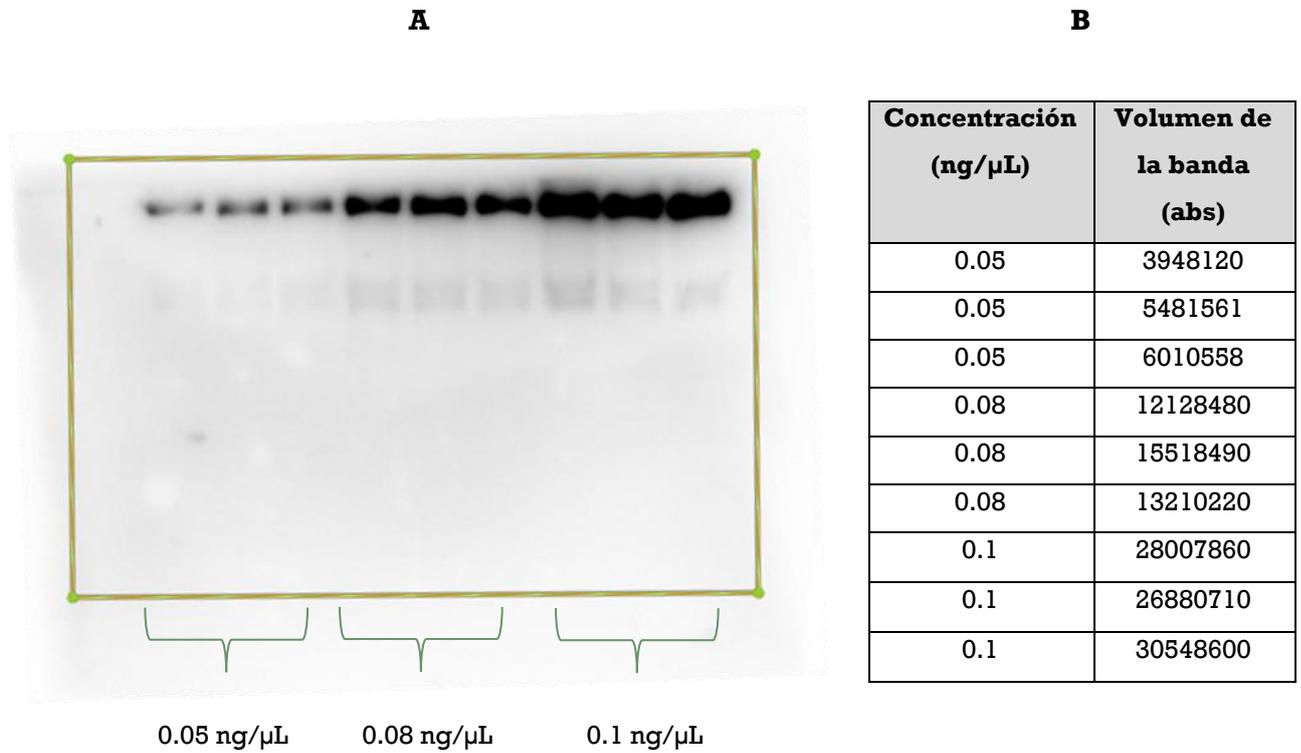


Figura 10.3.3 Ensayo de sensibilidad para CERA. A) Imagen representativa de la membrana. **B)** Resultados del volumen de banda en absorbancia obtenido para cada concentración a través del análisis de la membrana por el programa GasEPO.

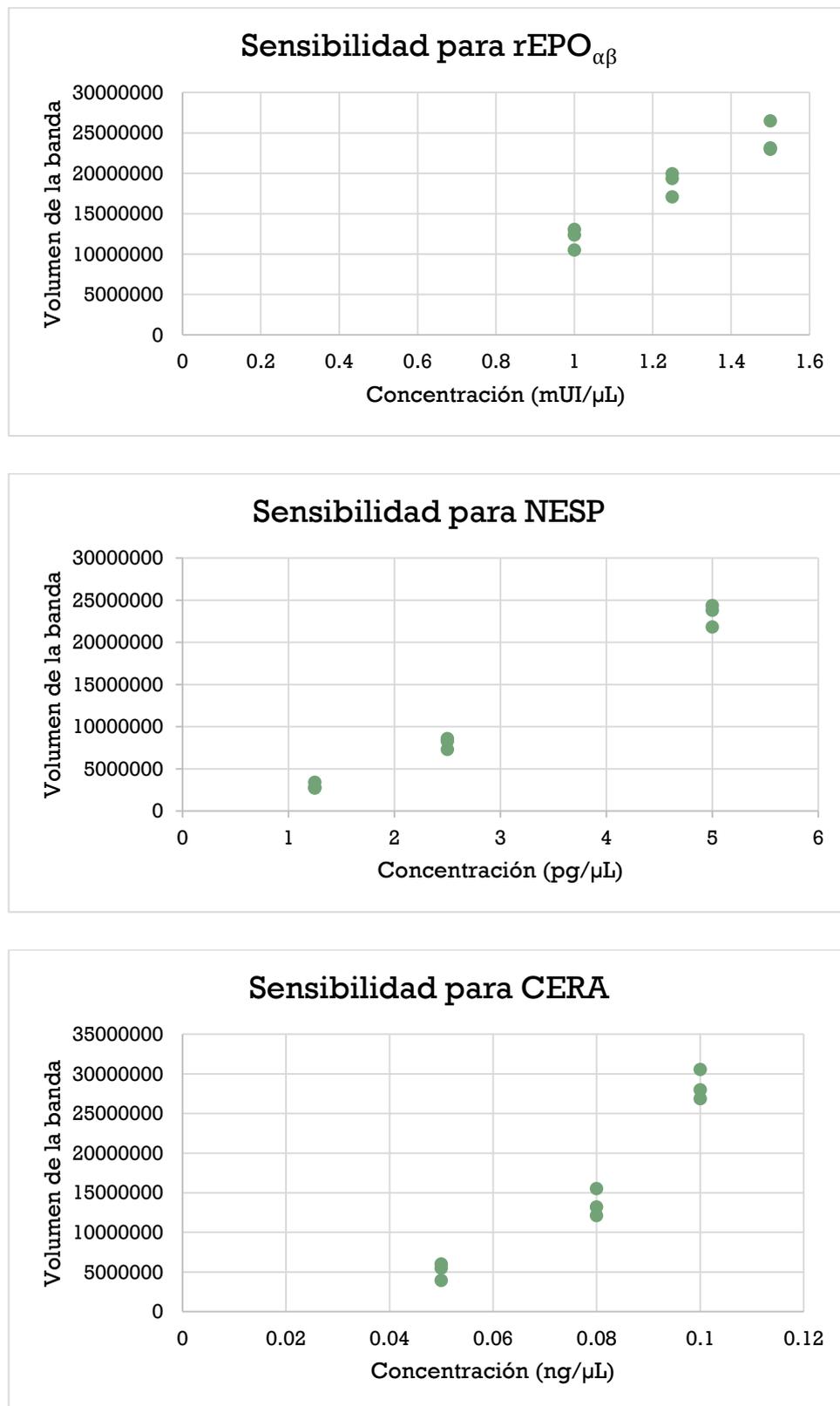


Figura 10.3.4 Gráficas del comportamiento de la sensibilidad para rEPO_{αβ}, NESP y CERA.



10.4 Repetibilidad

La repetibilidad para $rEPO_{\alpha\beta}$ se determinó analizando 3 alícuotas del control inferior de $rEPO_{\alpha\beta}$ a concentración de 0.75 mUI/ μ L y 3 alícuotas del control superior a concentración de 1.5 mUI/ μ L (Tablas 10.4.1 y 10.4.2).

Tabla 10.4.1 Determinación de la repetibilidad para $rEPO_{\alpha\beta}$ a concentración de 0.75 mUI/ μ L.

Analista	Fecha	Alícuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	11/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo

Tabla 10.4.2 Determinación de la repetibilidad para $rEPO_{\alpha\beta}$ a concentración de 1.5 mUI/ μ L.

Analista	Fecha	Alícuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	11/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo

Considerando que los resultados de repetibilidad para la identificación de $rEPO_{\alpha\beta}$ cumplieron con los criterios de aceptación y evaluación (Anexos 1 y 2), se concluye que el procedimiento es repetible para $rEPO_{\alpha\beta}$.

La repetibilidad para NESP se determinó analizando 3 alícuotas del control inferior de NESP a concentración de 2.5 pg/ μ L y 3 alícuotas del control superior a concentración de 10 pg/ μ L (Tablas 10.4.3 y 10.4.4).

Tabla 10.4.3 Determinación de la repetibilidad para NESP a concentración de 2.5 pg/ μ L.

Analista	Fecha	Alícuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	11/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo



Tabla 10.4.4 Determinación de la repetibilidad para NESP a concentración de 10 pg/ μ L.

Analista	Fecha	Alicuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	11/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo

Considerando que los resultados de repetibilidad para la identificación de NESP cumplieron con los criterios de aceptación y evaluación (Anexos 1 y 2), se concluye que el procedimiento es repetible para NESP.

La repetibilidad para CERA se determinó analizando 4 alícuotas del control inferior de CERA a concentración de 0.08 ng/ μ L y 4 alícuotas del control superior a concentración de 0.2 ng/ μ L (Tablas 10.4.5 y 10.4.6).

Tabla 10.4.5 Determinación de la repetibilidad para CERA a concentración de 0.08 ng/ μ L.

Analista	Fecha	Alicuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	25/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
		4	Cumple	Cumple	Positivo

Tabla 10.4.6 Determinación de la repetibilidad para CERA a concentración de 0.15 ng/ μ L.

Analista	Fecha	Alicuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	07/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
		2	Cumple	Cumple	Positivo
		3	Cumple	Cumple	Positivo
		4	Cumple	Cumple	Positivo

Considerando que los resultados de repetibilidad para la identificación de CERA cumplieron con los criterios de aceptación y evaluación (Anexos 1 y 2), se concluye que el procedimiento es repetible para CERA.



10.5 Contaminación por arrastre

10.5.1 Matriz de orina

Para evaluar el efecto de arrastre, se analizaron de manera alterna diferentes muestras de control positivo alto y control negativo. Los resultados se muestran en la Tabla 10.5.1.

Tabla 10.5.1 Resultados de contaminación por arrastre en matriz de orina con base en los criterios de evaluación y aceptación (Anexos 1 y 2).

Carril	Muestra	Evaluación
1	BLOR rEPO/NESP	Negativo
2	rEPO	Positivo
3	BLOR rEPO/NESP	Negativo
4	NESP	Positivo
5	BLOR rEPO/NESP	Negativo
6	rEPO	Positivo
7	BLOR rEPO/NESP	Negativo
8	NESP	Positivo
9	BLOR rEPO/NESP	Negativo
10	rEPO	Positivo

Como controles positivos se utilizaron las siguientes disoluciones: rEPO_{αβ} de 1.5 mUI/μL y NESP a 5 pg/μL. Como control negativo se utilizaron 5 muestras diferentes de orinas negativas para rEPO_{αβ} y NESP (BLOR rEPO/NESP).

En los resultados mostrados en la Figura 10.5.1, se puede observar que no existe un efecto de arrastre o contaminación entre los pozos.

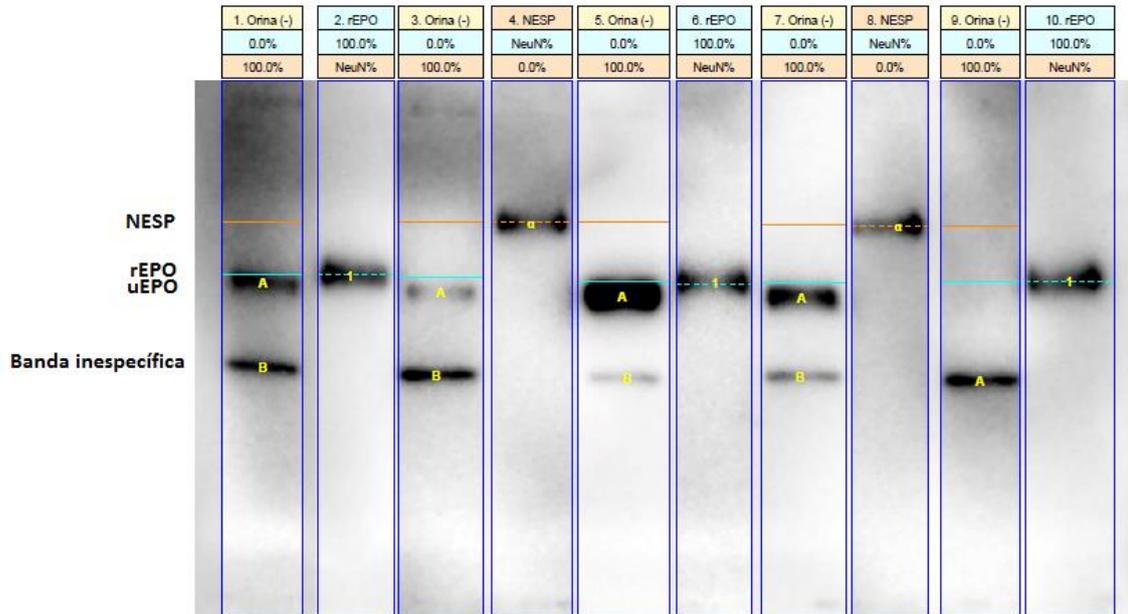


Figura 10.5.1 Análisis por GasEPO de la membrana correspondiente al ensayo de contaminación por arrastre en matriz de orina.

10.5.2 Matriz de suero

Para evaluar el efecto de arrastre en matriz de suero, se analizaron de manera alterna diferentes muestras de control positivo alto para CERA y control negativo. Los resultados se muestran en la Tabla 10.5.2, de acuerdo al orden en el que fueron cargadas en el gel.

Tabla 10.5.2 Resultados de contaminación por arrastre en matriz de suero con base en los criterios de evaluación y aceptación (Anexos 1 y 2).

Carril	Muestra	Evaluación
1	Suero (-)	Negativo
2	CERA	Positivo
3	Suero (-)	Negativo
4	CERA	Positivo
5	Suero (-)	Negativo
6	CERA	Positivo
7	Suero (-)	Negativo
8	CERA	Positivo
9	Suero (-)	Negativo
10	CERA	Positivo

Como control positivo se utilizó suero humano fortificado con CERA a concentración de 0.25 ng/ μ L y como control negativo se utilizó suero humano negativo para CERA.

Al realizar el análisis de los resultados se puede observar que en los carriles 3, 5 y 9 de la membrana existe una señal quimioluminiscente debido a la gran intensidad de las bandas que corresponden al control positivo adyacente a estos carriles, sin embargo en las imágenes individuales de cada carril se puede observar la ausencia de bandas compatibles con las proteínas de interés demostrando que al momento de cargar las muestras en el gel no existe contaminación entre ellas.

Con base en los resultados mostrados en la Figura 10.5.2, se puede observar que no existe un efecto de arrastre entre las muestras.

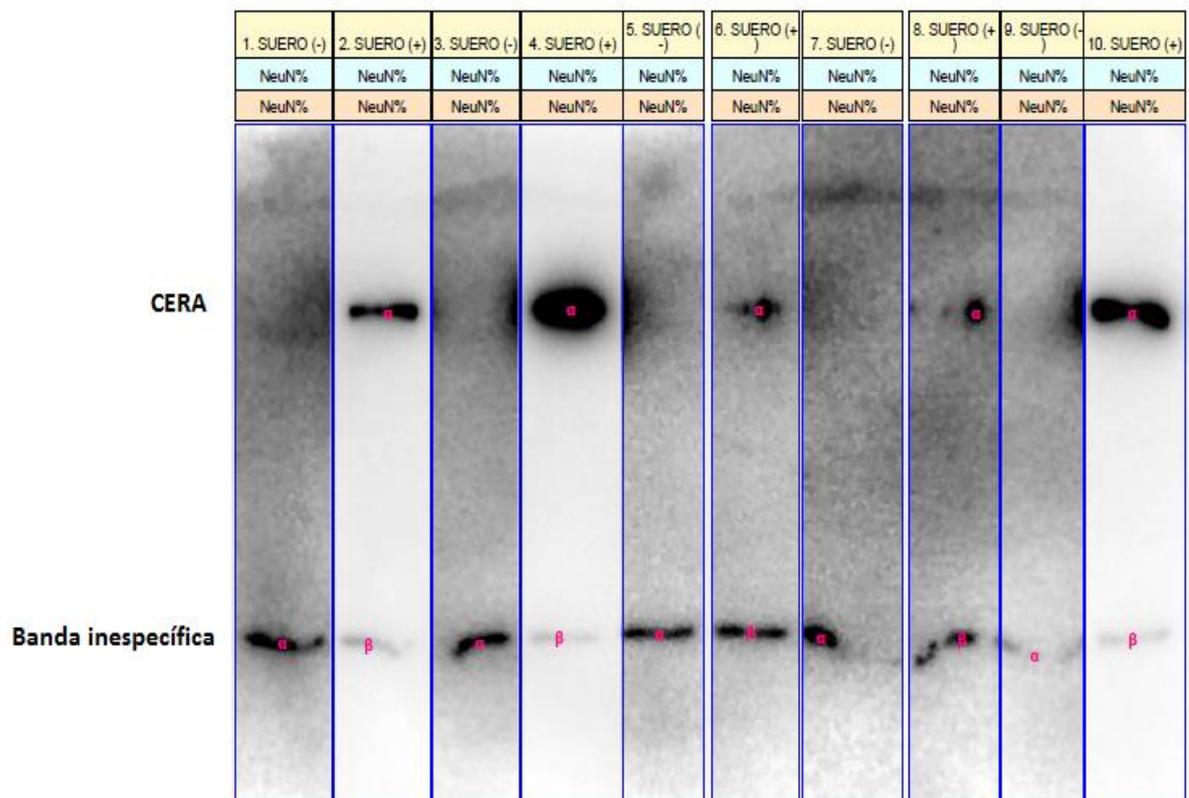


Figura 10.5.2 Análisis por Gas EPO de la membrana correspondiente al ensayo de contaminación por arrastre en matriz de suero.

10.6 Intervalo de trabajo

Para conocer el intervalo de trabajo se analizaron concentraciones altas de las disoluciones de NESP, rEPO_{αβ} y CERA.

El límite inferior del intervalo de trabajo para los analitos de interés se estableció con base en la concentración más pequeña donde se pudo observar una señal clara y definida; el límite superior se estableció en la concentración más alta donde no se observó contaminación de la señal quimioluminiscente entre carriles.

Para rEPO_{αβ} se analizaron las concentraciones de 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 y 3.5 mUI/μL. El límite inferior para este analito se estableció en 0.75 mUI/μL (ver resultados del límite de detección) y el límite superior en 1.5 mUI/μL, debido a que en la concentración de 2.0 mUI/μL se observó contaminación de la señal quimioluminiscente entre carriles (Figura 10.6.1).

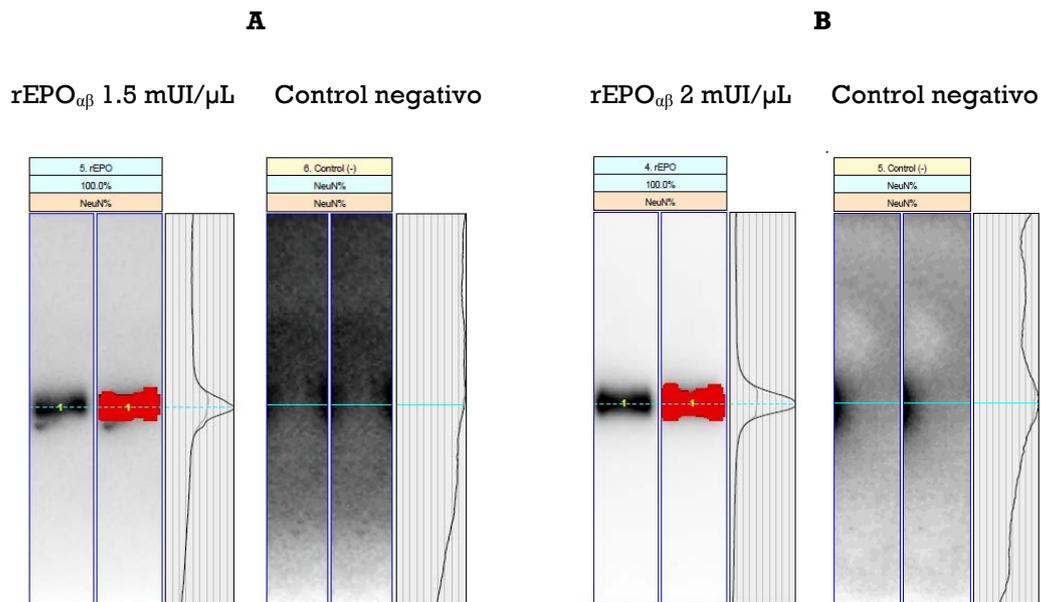


Figura 10.6.1 Determinación del Intervalo de trabajo para rEPO_{αβ}. **A)** Imagen representativa de un ensayo de concentración de 1.5 mUI/μL de rEPO_{αβ} y una muestra control negativa (agua). Obsérvese la ausencia de señal en el control negativo. **B)** Imagen representativa de un ensayo de concentración de 2 mUI/μL de rEPO_{αβ} y una muestra control negativa (agua). Obsérvese la contaminación de la señal quimioluminiscente en el carril correspondiente al control negativo.

Para NESP se analizaron las concentraciones de 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 12.5, 15.0 $\text{pg}/\mu\text{L}$. El límite inferior para este analito se estableció en 2.5 $\text{pg}/\mu\text{L}$ (ver resultados del límite de detección) y el límite superior en 10 $\text{pg}/\mu\text{L}$, debido a que en la concentración de 12.5 $\text{pg}/\mu\text{L}$ se observó contaminación de la señal quimioluminiscente entre carriles (Figura 10.6.2).

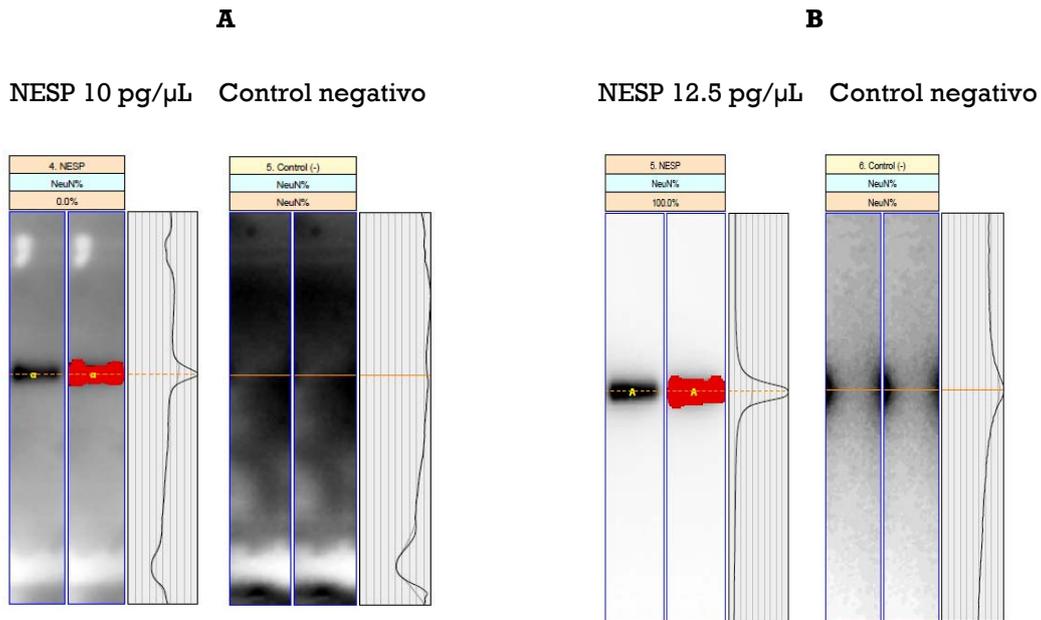


Figura 10.6.2 Determinación del Intervalo de trabajo para NESP. **A)** Imagen representativa de un ensayo de concentración de 10 $\text{pg}/\mu\text{L}$ de NESP y una muestra control negativa (agua). Obsérvese la ausencia de señal en el control negativo. **B)** Imagen representativa de un ensayo de concentración de 12.5 $\text{pg}/\mu\text{L}$ de NESP y una muestra control negativa (agua). Obsérvese la contaminación de la señal quimioluminiscente en el carril correspondiente al control negativo.

Para CERA se analizaron las concentraciones de 0.03, 0.05, 0.08, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.50, 0.75 y 1.00 ng/ μ L. El límite inferior para este analito se estableció en 0.08 ng/ μ L (ver resultados del límite de detección) y el límite superior en 0.2 ng/ μ L, debido a que en la concentración de 0.25 ng/ μ L se observó contaminación de la señal quimioluminiscente entre carriles (Figura 10.6.3).

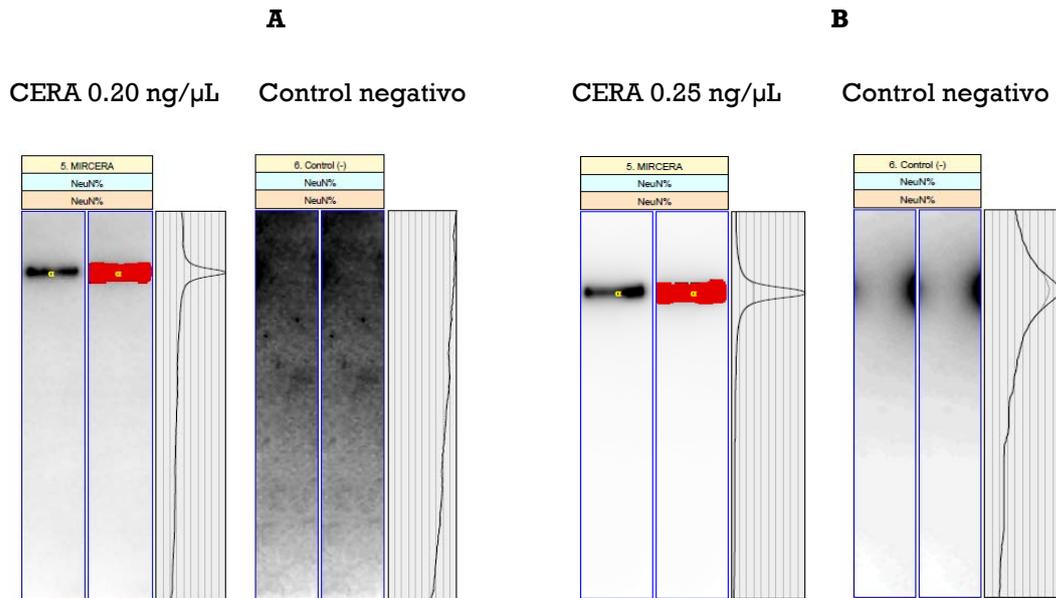


Figura 10.6.3. Determinación del Intervalo de trabajo para CERA. **A)** Imagen representativa de un ensayo de concentración de 0.20 ng/ μ L de CERA y una muestra control negativa (agua). Obsérvese la ausencia de señal en el control negativo. **B)** Imagen representativa de un ensayo de concentración de 0.25 ng/ μ L de CERA y una muestra control negativa (agua). Obsérvese la contaminación de la señal quimioluminiscente en el carril correspondiente al control negativo.



10.7 Reproducibilidad (precisión intermedia)

La reproducibilidad se determinó analizando al menos 2 alícuotas de 4 concentraciones de cada analito de interés en al menos 2 ensayos independientes entre sí por 3 analistas (Tablas 10.7.2 a 10.7.13). Las concentraciones analizadas para cada analito se muestran en la Tabla 10.7.1.

Tabla 10.7.1 Concentraciones de cada analito analizado.

Analito	Concentración			
	1	2	3	4
rEPO _{αβ} (mUI/μL)	0.50	0.75	1.0	1.5
NESP (pg/μL)	1.25	2.5	5.0	10
CERA (ng/μL)	0.05	0.08	0.10	0.15

Se consideró que el procedimiento era reproducible para la determinación de rEPO_{αβ}, NESP y CERA cuando todos los resultados cumplieran con los criterios de aceptación y evaluación de resultados.

En las Figuras 10.7.1 a 10.7.3 se muestran imágenes representativas del análisis de rEPO_{αβ}, NESP y CERA, respectivamente, de cada uno de los analistas que participaron en la evaluación de este parámetro.

En las Tablas 10.7.2 a 10.7.13, se muestran los resultados de cada concentración analizada de cada analito por cada ensayo de cada analista y el resultado de la evaluación de cada uno de ellos.

Para la determinación de rEPO_{αβ} a concentración de 0.5 mUI/μL (Cuadro 10.7.6), se consideró que el procedimiento presentó una baja reproducibilidad debido a que en uno de los 7 ensayos realizados no se detectó este analito. Para las concentraciones ≥ 0.75 mUI/μL, correspondiendo esta concentración al límite de detección, el procedimiento fue reproducible en todos los ensayos (ver resultados en los Cuadros 10.7.7 al 10.7.9).

Para la determinación de NESP a concentración de 1.25 pg/μL (Cuadro 10.7.2), se consideró que el procedimiento presentó una baja reproducibilidad debido a que en la tercera parte de los ensayos, este analito no fue detectado. Sin embargo, a concentraciones ≥ 2.5 pg/μL, correspondiendo esta concentración al límite de detección, el procedimiento fue reproducible en todos los ensayos (ver resultados en los Cuadros 10.7.3 al 10.7.5).

Para la determinación de CERA a concentración de 0.05 ng/ μ L (Cuadro 10.7.10), se consideró que el procedimiento presentó una baja reproducibilidad debido a que en más de la tercera parte de los ensayos, este analito no fue detectado. Sin embargo, a concentraciones \geq 0.08 ng/ μ L, correspondiendo esta concentración al límite de detección, el procedimiento fue reproducible en la mayoría de las alícuotas de todos los ensayos (ver resultados en los Cuadros 10.7.11 al 10.7.13). Las alícuotas que no cumplieron con los criterios de evaluación fueron debido a la presencia de artefactos que impidieron su evaluación, sin embargo, se consideró que el procedimiento es reproducible debido a que este efecto fue independiente de la concentración del analito.

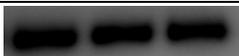
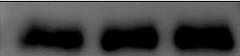
Analista	Concentración de rEPO $_{\alpha\beta}$			
	0.5 mUI/ μ L	0.75 mUI/ μ L	1 mUI/ μ L	1.5 mUI/ μ L
1				
2				
3				

Figura 10.7.1 Ensayo de reproducibilidad para la determinación de rEPO $_{\alpha\beta}$. Imágenes representativas de al menos 3 ensayos realizados por 3 analistas diferentes.

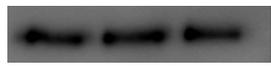
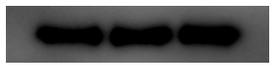
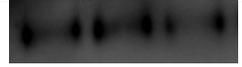
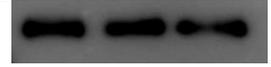
Analista	Concentración de NESP			
	1.25 pg/μL	2.5 pg/μL	5 pg/μL	10 pg/μL
1				
2				
3				

Figura 10.7.2 Ensayo de reproducibilidad para la determinación de NESP. Imágenes representativas de al menos 3 ensayos realizados por 3 analistas diferentes.

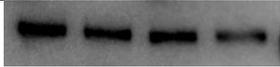
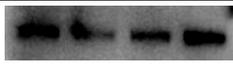
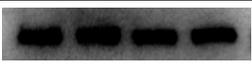
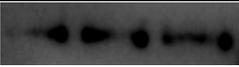
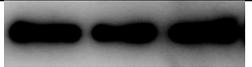
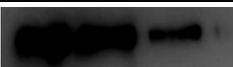
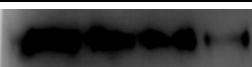
Analista	Concentración de CERA			
	0.05 ng/μL	0.08 ng/μL	0.1 ng/μL	0.15 ng/μL
1				
2				
3				

Figura 10.7.3 Ensayo de reproducibilidad para la determinación de CERA. Imágenes representativas de al menos 3 ensayos realizados por 3 analistas diferentes.



Tabla 10.7.2 Determinación de la reproducibilidad para $rEPO_{\alpha\beta}$ a concentración de 0.5 mUI/ μ L.

Analista	Fecha	Alicuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	11/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	11/01/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	11/01/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	16/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	16/01/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	16/01/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	18/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	18/01/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	18/01/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	16/04/2013	1	No cumple	No cumple	BND
2	16/04/2013	2	No cumple	No cumple	BND
2	16/04/2013	3	No cumple	No cumple	BND
2	30/04/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
2	30/04/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
2	30/04/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	09/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	09/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	09/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	09/07/2013	4	No cumple	No cumple	Mancha
3	10/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo



Tabla 10.7.3 Determinación de la reproducibilidad para rEPO $_{\alpha\beta}$ a concentración de 0.75 mUI/ μ L.

Analista	Fecha	Alicuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	11/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	11/01/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	11/01/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	16/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	16/01/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	16/01/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	18/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	18/01/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	18/01/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	16/04/2013	1	No cumple	No cumple	BND
2	16/04/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
2	16/04/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	30/04/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
2	30/04/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
2	30/04/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	09/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	09/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	09/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	09/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo



Tabla 10.7.4 Determinación de la reproducibilidad para $rEPO_{\alpha\beta}$ a concentración de 1 mUI/ μ L.

Analista	Fecha	Alicuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	11/01/2013	1	No cumple	No cumple	?
1	11/01/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	11/01/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	16/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	16/01/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	16/01/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	18/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	18/01/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	18/01/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	29/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
2	29/01/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
2	29/01/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	30/04/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
2	30/04/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
2	30/04/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	09/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	09/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	09/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	09/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
3	11/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	11/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	11/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	11/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo



Tabla 10.7.5 Determinación de la reproducibilidad para $rEPO_{\alpha\beta}$ a concentración de 1.5 mUI/mL.

Analista	Fecha	Alicuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	11/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	11/01/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	11/01/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	16/04/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	16/04/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	16/04/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	29/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
2	29/01/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
2	29/01/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	30/04/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
2	30/04/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
2	30/04/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	02/04/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	02/04/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	02/04/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	02/04/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	02/04/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	02/04/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	09/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	09/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	09/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	09/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo



Tabla 10.7.6 Determinación de la reproducibilidad para NESP a concentración de 1.25 pg/ μ L.

Analista	Fecha	Alícuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	11/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	11/01/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	11/01/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	16/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	16/01/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	16/01/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	18/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	18/01/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	18/01/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	23/04/2013	1	No cumple	No cumple	Elevado BG
1	23/04/2013	2	No cumple	No cumple	Elevado BG
1	23/04/2013	3	No cumple	No cumple	Elevado BG
2	12/04/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
2	12/04/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
2	12/04/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	09/07/2013	1	No cumple	No cumple	BND
2	09/07/2013	2	No cumple	No cumple	BND
2	09/07/2013	3	No cumple	No cumple	BND
2	09/07/2013	4	No cumple	No cumple	BND
3	23/04/2013	1	No cumple	No cumple	BND
3	23/04/2013	2	No cumple	No cumple	BND
3	23/04/2013	3	No cumple	No cumple	BND
3	23/04/2013	4	No cumple	No cumple	BND
3	10/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	4	No cumple	No cumple	Mancha



Tabla 10.7.7 Determinación de la reproducibilidad para NESP a concentración de 2.5 pg/ μ L.

Analista	Fecha	Alicuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	11/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	11/01/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	11/01/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	16/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	16/01/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	16/01/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	18/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	18/01/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	18/01/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	12/04/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
2	12/04/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
2	12/04/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	09/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
2	09/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
2	09/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	09/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
3	23/04/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	23/04/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	23/04/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	23/04/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo



Tabla 10.7.8 Determinación de la reproducibilidad para NESP a concentración de 5 pg/ μ L.

Analista	Fecha	Alicuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	11/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	11/01/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	11/01/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	16/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	16/01/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	16/01/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	18/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	18/01/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	18/01/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	28/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	28/01/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	28/01/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	23/04/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	23/04/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	23/04/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	12/04/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
2	12/04/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
2	12/04/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	16/04/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
2	16/04/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
2	16/04/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	09/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
2	09/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
2	09/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	09/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
3	02/04/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	02/04/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	02/04/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	02/04/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	02/04/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	02/04/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	23/04/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	23/04/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	23/04/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	23/04/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo



Tabla 10.7.9 Determinación de la reproducibilidad para NESP a concentración de 10 pg/ μ L.

Analista	Fecha	Alícuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	11/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	11/01/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	11/01/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	28/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	28/01/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	28/01/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	23/04/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	23/04/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	23/04/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	29/01/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
2	29/01/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
2	29/01/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	12/04/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
2	12/04/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
2	12/04/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	16/04/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
2	16/04/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
2	16/04/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	09/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
2	09/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
2	09/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	09/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
3	11/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	11/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	11/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	11/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo



Tabla 10.7.10 Determinación de la reproducibilidad para CERA a concentración de 0.05 ng/ μ L.

Analista	Fecha	Alícuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	25/06/2013	1	No cumple	No cumple	BND
1	25/06/2013	2	No cumple	No cumple	BND
1	25/06/2013	3	No cumple	No cumple	BND
1	25/06/2013	4	No cumple	No cumple	BND
1	28/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	28/06/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	28/06/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	28/06/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
1	04/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	04/07/2013	2	No cumple	No cumple	BND
1	04/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	04/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
2	25/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
2	25/06/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
2	25/06/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	25/06/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
2	28/06/2013	1	No cumple	No cumple	BND
2	28/06/2013	2	No cumple	No cumple	BND
2	28/06/2013	3	No cumple	No cumple	BND
2	28/06/2013	4	No cumple	No cumple	BND
2	04/07/2013	1	No cumple	No cumple	BND
2	04/07/2013	2	No cumple	No cumple	BND
2	04/07/2013	3	No cumple	No cumple	BND
2	04/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
3	11/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	11/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	11/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	11/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo



Tabla 10.7.11 Determinación de la reproducibilidad para CERA a concentración de 0.08 ng/μL.

Analista	Fecha	Alicuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	25/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	25/06/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	25/06/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	25/06/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
1	28/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	28/06/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	28/06/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	28/06/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
1	04/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	04/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	04/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	04/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
2	25/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
2	25/06/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
2	25/06/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	25/06/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
2	28/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
2	28/06/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
2	28/06/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	28/06/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
2	04/07/2013	1	No cumple	No cumple	Mancha
2	04/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
2	04/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	04/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	1	No cumple	No cumple	No definida
3	10/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	4	No cumple	No cumple	Mancha
3	11/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	11/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	11/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	11/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo



Tabla 10.7.12 Determinación de la reproducibilidad para CERA a concentración de 0.10 ng/ μ L.

Analista	Fecha	Alicuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	07/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	07/06/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	07/06/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	07/06/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
1	25/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	25/06/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	25/06/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	25/06/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
1	28/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	28/06/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	28/06/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	28/06/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
2	25/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
2	25/06/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
2	25/06/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	25/06/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
2	04/07/2013	1	No cumple	No cumple	Mancha
2	04/07/2013	2	No cumple	No cumple	Mancha
2	04/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	04/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
3	09/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	09/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	09/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	09/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
3	11/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	11/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	11/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	11/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo



Tabla 10.7.13 Determinación de la reproducibilidad para CERA a concentración de 0.15 ng/μL.

Analista	Fecha	Alicuota	Criterios de aceptación	Criterios de evaluación	Resultado
1	07/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	07/06/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	07/06/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	07/06/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
1	25/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	25/06/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	25/06/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	25/06/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
1	28/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
1	28/06/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
1	28/06/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
1	28/06/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
2	25/06/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
2	25/06/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
2	25/06/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	25/06/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
2	04/07/2013	1	No cumple	No cumple	Mancha
2	04/07/2013	2	No cumple	No cumple	Mancha
2	04/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
2	04/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
3	09/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	09/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	09/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	09/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	10/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo
3	11/07/2013	1	Cumple	Cumple	Positivo
3	11/07/2013	2	Cumple	Cumple	Positivo
3	11/07/2013	3	Cumple	Cumple	Positivo
3	11/07/2013	4	Cumple	Cumple	Positivo

10.8 Rendimiento del proceso de inmunopurificación

Para evaluar este parámetro se analizaron 8 muestras positivas para cada analito de interés. 4 muestras fueron fortificadas con el analito de interés y fueron sometidas al proceso de inmunopurificación (muestras inmunopurificadas); 4 muestras fueron fortificadas con el analito de interés y se analizaron sin ser sometidas al proceso de inmunopurificación (muestras no inmunopurificadas). Todas las muestras fueron analizadas dentro del mismo ensayo para cada analito. Las muestras fueron cargadas en el gel de manera alterna. (Tabla 10.8.1).

Tabla 10.8.1 Distribución de muestras en el gel para evaluar el rendimiento del proceso de inmunopurificación.

Pozo	Muestra
1	Control rEPO/NESP/CERA
2	Inmunopurificada
3	No inmunopurificada
4	Inmunopurificada
5	No inmunopurificada
6	Inmunopurificada
7	No inmunopurificada
8	Inmunopurificada
9	No inmunopurificada
10	Control rEPO/NESP/CERA

Para la determinación del rendimiento del proceso de inmunopurificación para rEPO $_{\alpha\beta}$ se cargaron muestras de orina humana a una concentración de 0.75 mUI/ μ L, la cual es la concentración media del intervalo de trabajo (Tabla 10.8.2).

Se utilizó un control positivo para rEPO/NESP/CERA, al principio y al final de la secuencia para establecer la zona de positividad (Figura 10.8.1).

Tabla 10.8.2 Determinación del rendimiento del proceso de inmunopurificación para rEPO $_{\alpha\beta}$. Los valores del volumen de la banda fueron obtenidos con el programa GasEPO.

	rEPO $_{\alpha\beta}$ 0.75 mUI/ μ L	
	Muestra inmunopurificada	Estándar (no inmunopurificada)
Volumen de la banda (Abs.)	1987635	3227532
	2431187	2769289
	3126993	2211930
	1529934	1548745
MEDIA	2268937	2439374
DESVIACIÓN	680157	724566
CV	29.98	29.7
RENDIMIENTO	93.01%	100%

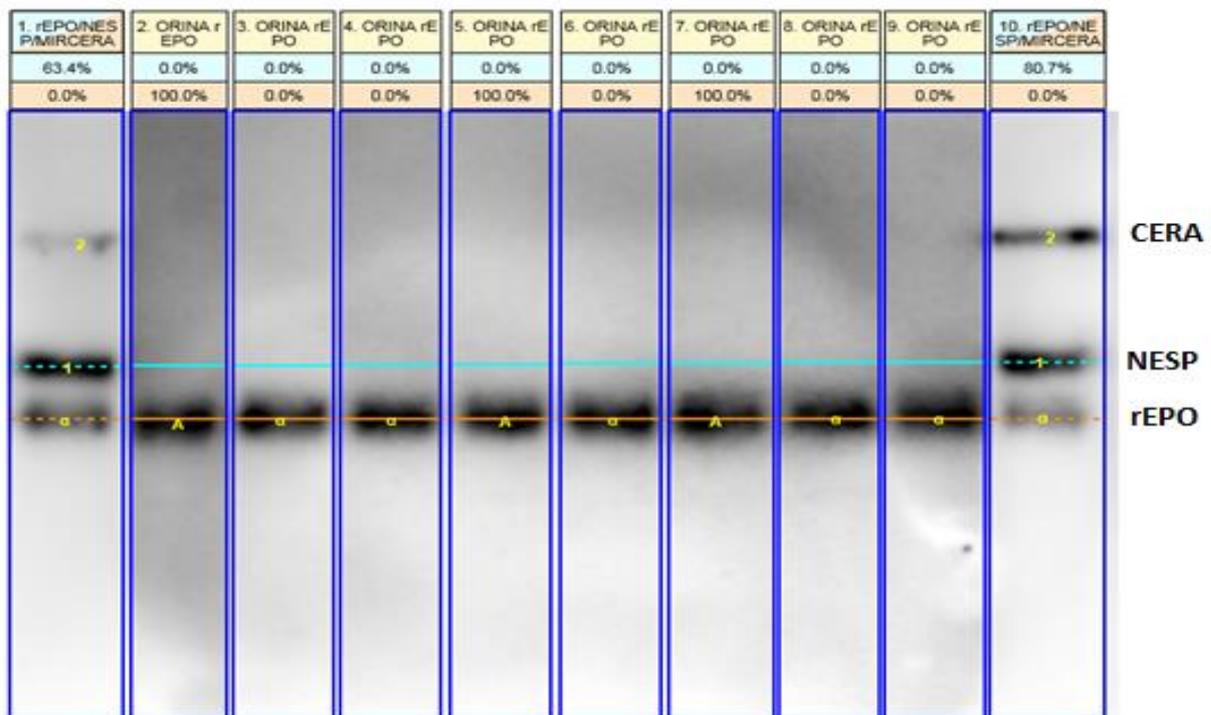


Figura 10.8.1 Análisis por GasEPO de la membrana correspondiente al ensayo de rendimiento del proceso de inmunopurificación para rEPO $_{\alpha\beta}$.

Para la determinación del Rendimiento de inmunopurificación para NESP se cargaron muestras de orina humana a una concentración de 10 pg/ μ L, la cual es la concentración media del intervalo de trabajo (Tabla 10.8.3).

Se utilizó un control positivo para rEPO/NESP/CERA, al principio y al final de la secuencia para establecer la zona de positividad (Figura 10.8.2).

Tabla 10.8.3 Determinación del rendimiento del proceso de inmunopurificación para NESP. Los valores del volumen de la banda fueron obtenidos con el programa GasEPO.

	NESP 10 pg/ μ L	
	Muestra inmunopurificada	Estándar (no inmunopurificada)
Volumen de la banda (Abs.)	2595398	2769847
	1476059	2438460
	2345635	4655659
	1499847	4174828
Media:	1979235	3509699
Desviación std:	576456	1072467
CV:	29.12	30.55
Rendimiento:	56.39%	100%

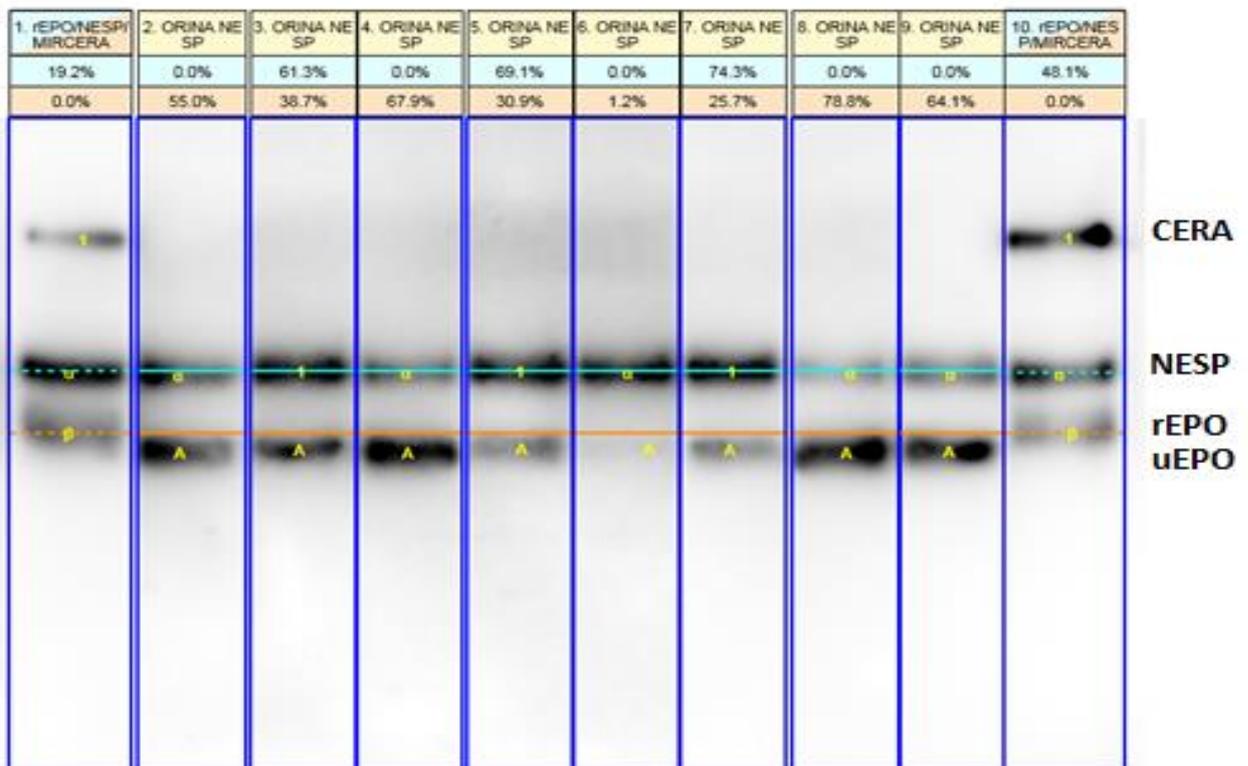


Figura 10.8.2 Análisis por GasEPO de la membrana correspondiente al ensayo de rendimiento del proceso de inmunopurificación para NESP, se observa la banda característica de uEPO.

Para la determinación del rendimiento del proceso de inmunopurificación para CERA se cargaron muestras de suero humano a una concentración de 0.1 ng/μL, la cual es la concentración media del intervalo de trabajo (Tabla 10.8.4).

Tabla 10.8.4 Determinación del rendimiento del proceso de inmunopurificación para CERA. Los valores del volumen de la banda fueron obtenidos con el programa GasEPO.

	CERA 0.1 ng/μL	
	Muestra inmunopurificada	Estándar (no inmunopurificada)
Volumen de la banda (Abs.)	11315830	10885190
	7997208	10318450
	2138933	11624570
	5502120	13893580
MEDIA	6738523	11680448
DESVIACIÓN	3882480	1569347
CV	57.61	13.44
RENDIMIENTO	57.70%	100%

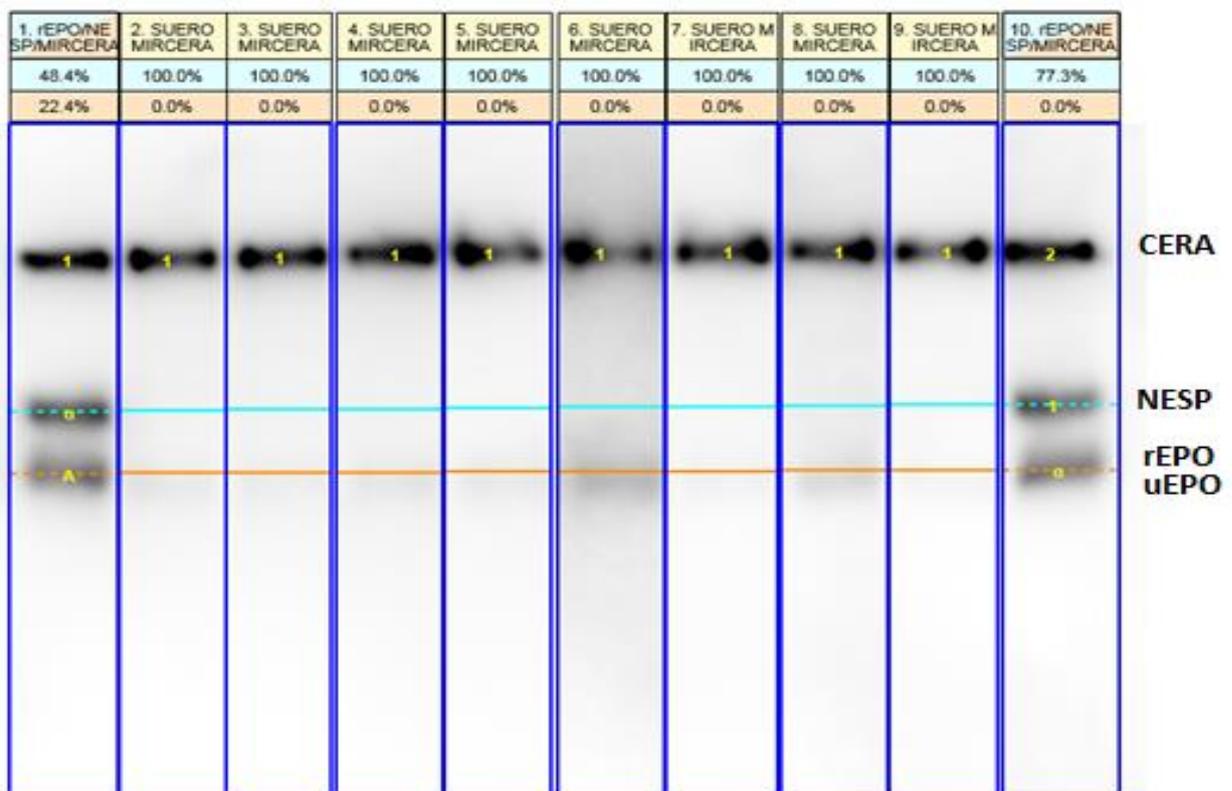


Figura 10.8.3 Análisis por GasEPO de la membrana correspondiente al ensayo de rendimiento del proceso de inmunopurificación para CERA, en los carriles 6 y 8 se observa la banda característica de uEPO.

En las Figuras 10.8.4 y 10.8.5 podemos observar los resultados del rendimiento del proceso de inmunopurificación en función del volumen de la banda y en función del porcentaje para rEPO $_{\alpha\beta}$, NESP y CERA.

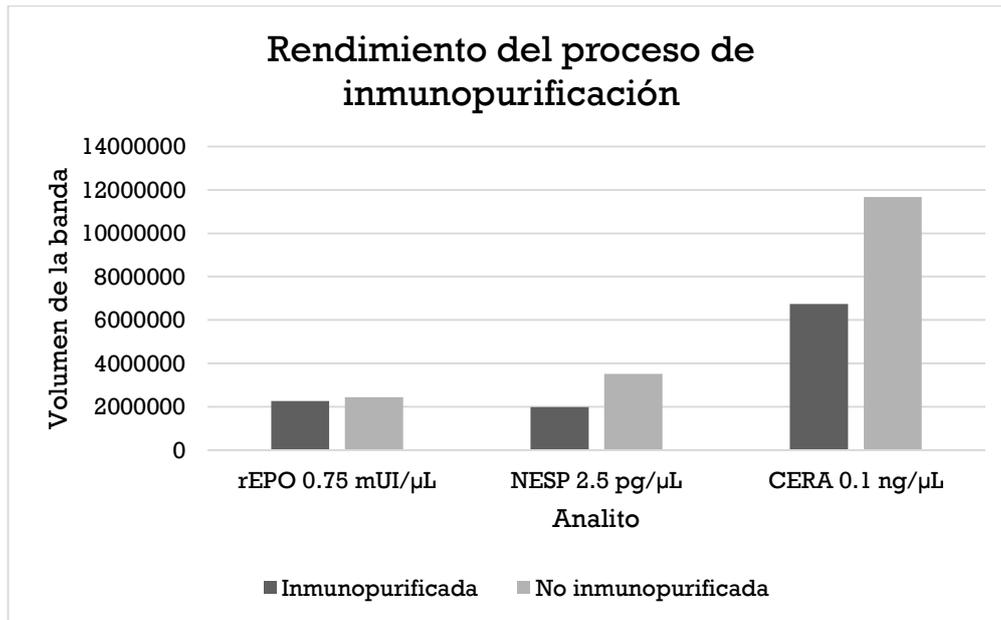


Figura 10.8.4 Rendimiento del proceso de inmunopurificación en función del volumen de la banda.

Con estos resultados se puede concluir que la molécula de rEPO es la que va a ser recuperada en un rendimiento mayor con respecto a NESP y CERA bajo las mismas condiciones experimentales.

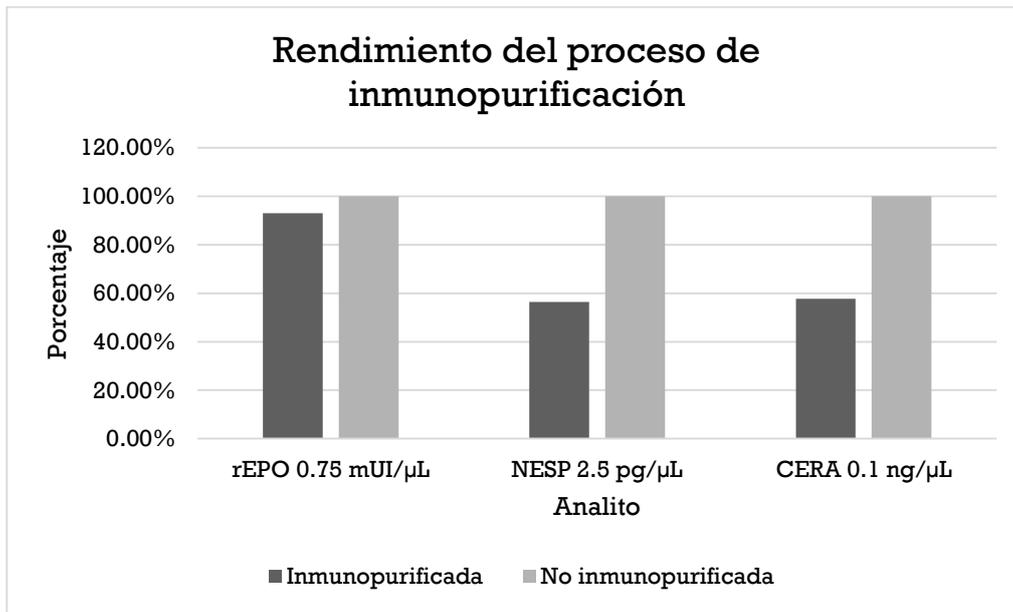


Figura 10.8.5 Rendimiento del proceso de inmunopurificación en función del porcentaje.

10.9 Influencia del tipo de transferencia sobre los resultados

Dentro de las variantes de la técnica de Western-Blot, se encuentra el uso de la transferencia húmeda y semi-seca.

Para evaluar si el tipo de transferencia influye sobre los resultados de cada analito, se utilizaron ambos tipos de transferencia a diferentes concentraciones de rEPO_{αβ}, NESP y CERA (Figuras 10.9.1 a 10.9.3).

Para la detección de los tres analitos (rEPO_{αβ}, NESP y CERA), en todas las concentraciones analizadas, ambos tipos de transferencia permitieron evaluar adecuadamente los resultados con base en los criterios de evaluación y aceptación indicados en los Anexos 1 y 2.

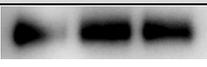
Transferencia	0.5 mUI/μL	0.75 mUI/μL	1 mUI/μL
Húmeda			
Semi-seca			

Figura 10.9.1 rEPO_{αβ} a diferentes concentraciones.

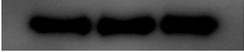
Transferencia	1.25 pg/ μ L	2.5 pg/ μ L	10 pg/ μ L
Húmeda			
Semi-seca			

Figura 10.9.2 NESP a diferentes concentraciones.

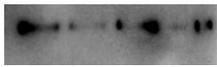
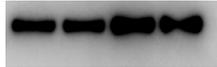
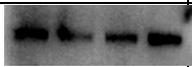
Transferencia	0.1 ng/ μ L	0.15 ng/ μ L	0.2 ng/ μ L	0.25 ng/ μ L
Húmeda				
Semi-seca				

Figura 10.9.3 CERA a diferentes concentraciones.

Con base en la calidad de las bandas observadas en los resultados se concluye que el uso de la transferencia húmeda para la determinación de la presencia de rEPO $_{\alpha\beta}$ y NESP se ve favorecida, ya que se observan bandas más definidas y claras (Figuras 10.9.1 y 10.9.2, respectivamente). La transferencia en cámara semi-seca favorece en gran medida la detección de CERA a las 3 concentraciones observadas de una manera más definida que las bandas obtenidas en cámara húmeda (Figura 10.9.3).



11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El sistema de Gestión de la Calidad del LNPCD de la CONADE basado en la Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006 que en su punto 5.4.5.2 indica que los métodos analíticos empleados deben de estar validados para garantizar resultados confiables. La validación involucra la realización de ensayos para obtener parámetros que describen la funcionalidad del método, así como sus limitaciones. Los parámetros que se evaluaron fueron: límite de detección, selectividad/especificidad, sensibilidad, repetibilidad, reproducibilidad, contaminación por arrastre, intervalo de trabajo y rendimiento del proceso de inmunopurificación.

Límite de detección.

El límite de detección se define como la concentración más baja a la cual puede detectarse el analito bajo las condiciones experimentales establecidas. Para la evaluación de este parámetro se analizaron disoluciones preparadas en agua a concentraciones conocidas para cada uno de los analitos de interés (NESP, rEPO_{αβ} y CERA).

El criterio que se empleó para definir el límite de detección, fue la detección de las bandas en el 100% de los ensayos realizados para cada concentración.

Para conocer el límite de detección de rEPO_{αβ} se realizaron 4 ensayos para cada una de las concentraciones (0.5 mUI/μL, 0.75 mUI/μL, 1.0 mUI/μL y 1.5 mUI/μL). La concentración de 0.5 mUI/μL se detectó en 3 ensayos de 4, las concentraciones ≥ 0.75 mUI/μL se detectaron en 4 de 4 ensayos, por lo tanto, el límite de detección se estableció en la concentración de 0.75 mUI/μL.

Para conocer el límite de detección de NESP se realizaron 4 ensayos para cada una de las concentraciones (1.25 pg/μL, 2.5 mUI/μL, 5 pg/μL y 10 pg/μL). La concentración de 1.25 pg/μL se detectó en 3 ensayos de 4, las concentraciones ≥ 2.5 pg/μL se detectaron en 4 de 4 ensayos, por lo tanto, el límite de detección se estableció en la concentración de 2.5 pg/μL.

Para conocer el límite de detección de CERA se realizaron 4 ensayos para cada una de las concentraciones (0.05 ng/μL, 0.08 ng/μL, 0.1 ng/μL y 0.15 ng/μL). La concentración de 0.5



mUI/ μ L se detectó en 3 ensayos de 4, las concentraciones ≥ 0.75 mUI/ μ L se detectaron en 4 de 4 ensayos, por lo tanto, el límite de detección se estableció en la concentración de 0.08 ng/ μ L.

Selectividad/Especificidad.

La selectividad/especificidad se define como la capacidad de un método analítico para determinar la presencia de un analito dentro de una matriz compleja, sin ser interferido por otros componentes de la matriz. Con base en esta definición se diseñó un protocolo para evaluar la selectividad/especificidad que presenta nuestro procedimiento para rEPO $_{\alpha\beta}$, NESP y CERA. Se utilizaron cuatro muestras control positivo y cuatro muestras control negativo para cada analito. En las muestras control positivo se deberá de observar la presencia del analito de interés sin interferencias de otros componentes. En las muestras control negativo no se deberá de detectar la presencia del analito ni de alguna interferencia. Con los resultados obtenidos podemos asegurar que el procedimiento es selectivo/específico para rEPO $_{\alpha\beta}$, y NESP en matriz de orina, y para CERA en matriz de suero. Es importante señalar la presencia de una banda inespecífica en una zona de la membrana que no afecta la identificación de rEPO $_{\alpha\beta}$, NESP o CERA, la presencia de esta banda inespecífica es debido a la naturaleza policlonal del anticuerpo secundario que le permite reaccionar con múltiples epitopos de las proteínas. Algunos autores recomiendan que para eliminar este inconveniente se recomienda el empleo de una segunda transferencia, también llamada transferencia ácida que consiste en pasar el anticuerpo primario unido al antígeno a otra membrana para que de esta manera sólo se identifique lo reconocido por el anticuerpo primario monoclonal [Lasne, F.; Reichel, C.; Leuenberger, N.].

Sensibilidad.

La sensibilidad se define como el cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en la concentración del analito. Para determinar este parámetro se analizaron diferentes concentraciones de los analitos de interés en un mismo gel para cada analito, de esta forma observamos el comportamiento del volumen de las bandas para cada concentración. Con base en los resultados, se determinó que el procedimiento posee alta sensibilidad para rEPO $_{\alpha\beta}$, NESP y CERA al diferenciar la intensidad del volumen de banda (respuesta del instrumento) entre concentraciones muy cercanas.



Repetibilidad.

La repetibilidad se define como la precisión de la medida bajo condiciones semejantes, es decir, el mismo procedimiento de medición, el mismo analista, el mismo sistema de medida y el mismo lugar. Para conocer si el procedimiento es repetible, se analizaron las concentraciones alta y baja correspondientes al intervalo de trabajo de cada analito por triplicado bajo las mismas condiciones. Con base en los resultados se determinó que el procedimiento es repetible para los tres analitos.

Contaminación por arrastre.

La contaminación por arrastre, para fines de este procedimiento, es la presencia de bandas de cierto analito en los carriles adyacentes. Para conocer si existe contaminación por arrastre, se analizaron disoluciones control positivo y control negativo de manera intercalada en un mismo gel, de esta forma se logró observar si en los carriles adyacentes al analito (carriles control negativo) existía algún arrastre de bandas. Con base en los resultados se determinó que no existe ningún tipo de contaminación en matriz de orina (rEPO_{αβ} y NESP). Al analizar los resultados correspondientes a la matriz de suero, se observa contaminación de la señal quimioluminiscente, esto es atribuible a la concentración empleada para preparar las disoluciones control positivo de CERA (0.25 ng/μL), generando que la intensidad del volumen de la banda sea muy grande. Sin embargo, no existe un efecto de arrastre de bandas.

Intervalo de trabajo.

El intervalo de trabajo es aquel comprendido entre las concentraciones superior e inferior (incluyendo dichas concentraciones) y para las que se ha demostrado que el analito es cuantificado con un nivel satisfactorio de repetibilidad, recuperación y linealidad. Con base en esta definición se determinó que el límite inferior del intervalo de trabajo correspondería al límite de detección obtenido para cada analito. Para determinar el límite superior se analizaron diferentes concentraciones altas para cada analito y se estableció en aquella concentración donde no existiera contaminación de la señal quimioluminiscente entre carriles.



Reproducibilidad.

La reproducibilidad es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea por dos analistas o instrumentos diferentes, usando el mismo método en diferentes días. Para conocer si el procedimiento es reproducible, se realizó una serie de ensayos entre tres analistas diferentes y en diferentes días de análisis. Con base en los resultados obtenidos, se corroboró que el Intervalo de trabajo establecido para cada analito es reproducible.

Rendimiento del proceso de inmunopurificación.

El rendimiento del proceso de inmunopurificación es la cantidad de un analito que se recupera después de realizarlo. En este trabajo se evaluó el rendimiento del proceso de inmunopurificación, a través del análisis de muestras que se inmunopurificaron y de muestras que no se procesaron. Con base en los resultados, se observó que el rendimiento del proceso de inmunopurificación es adecuado para los tres analitos, ya que cumple con los parámetros establecidos por la WADA (rendimiento mayor al 50 % para cada analito) en su Documento Técnico TD2014EPO obteniendo el mayor rendimiento para $rEPO_{\alpha\beta}$.

Influencia del tipo de transferencia sobre la calidad de los resultados.

La transferencia dentro de la técnica de Western-Blot, es un paso crítico para la obtención de bandas de calidad aceptable en la membrana de PVDF. Por este motivo, se determinó cómo influye el tipo de transferencia a emplear en el proceso de detección. Los tipos de transferencia sugeridos por la WADA son la transferencia húmeda y la transferencia semi-seca. Con base en los resultados, determinamos que ambos tipos de transferencia son útiles para la obtención de bandas de buena calidad, sin embargo, se recomienda el uso de la transferencia húmeda para la determinación $rEPO_{\alpha\beta}$ Y NESP, así como, el uso de la transferencia semi-seca para la determinación de CERA, esto con base en las características de densidad, forma, ruido de fondo, etc., que presentaron las bandas de cada analito después de realizar cierto tipo de transferencia.



12. CONCLUSIONES

Con base en los resultados del presente trabajo de Tesis, se puede concluir que el procedimiento de detección y confirmación de la presencia de eritropoyetina recombinante, biosimilares y sustancias análogas en suero y orina humana realizado mediante la técnica de Western Blot con SDS-PAGE, quedó validado para su uso como un método cualitativo para la detección y confirmación de rEPO $_{\alpha\beta}$ y NESP en orina humana, así como para CERA en suero humano.

Se determinaron los siguientes parámetros:

- Límite de detección
- Selectividad/Especificidad
- Sensibilidad
- Repetibilidad
- Reproducibilidad
- Contaminación por arrastre
- Intervalo de trabajo
- Rendimiento del proceso de inmunopurificación
- Evaluar la influencia del tipo de transferencia sobre la calidad de los resultados.

Se demostró que al emplear este procedimiento se obtienen resultados confiables y que es adecuado para la confirmación de casos sospechosos de dopaje, dentro del Laboratorio Nacional de Prevención y Control del Dopaje, CONADE.

El tipo de transferencia (húmeda y semi-seca) no impactó en la detección de las bandas, pero se recomienda el uso de la transferencia húmeda para la determinación NESP y rEPO $_{\alpha\beta}$, así como el uso de la transferencia semi-seca para la determinación de CERA.



13. REFERENCIAS

- 1) Westermeier, R. *Electroforesis in Practice*. 4ª ed., Ed. Wiley-VHC, Germany, **2005**.
- 2) Jelkmann, W. E. *Regulation of Erythropoietin Production*. J. Physiol. **2011**.
- 3) Fuentes, A.; Castiñeiras, L.; Queraltó, C. *Bioquímica Clínica y Patología Molecular*. 2ª ed., Ed. Reverté, México, **1997**.
- 4) Rojas, O. *Inmunología (de memoria)*. 3ª ed., Editorial Médica Panamericana, México, **2006**.
- 5) Harris, D. C. *Análisis Químico Cuantitativo*. Traducción de la 6ª ed, Ed. Reverté, México, **2003**.
- 6) WADA. Technical Document: *Harmonization of analysis and reporting of recombinant erythropoietins (i.e. epoetins) and analogues (e.g. darbepoetin, pegserpoetin, peginesatide, epo-fc) by electrophoretic techniques*. TD2014EPO. V 1.0. **2014**.
- 7) WADA. *The World Antidoping Code: The 2015 Prohibited List*. International Standard. **2014**.
- 8) Reichel, C.; Kulovics, R.; Jordan, V.; Watzinger, M.; Geisendorfer, T. *SDS-PAGE of recombinant and endogenous erythropoietins: benefits and limitations of the method for application in doping control*. Drug Testing and Analysis. **2009**.
- 9) Ayotte, C.; Pascual, J. A.; Gmeiner, G.; Reichel, C.; Lasne, F.; Saugy, M. WADA Technical Document: *Harmonization of the method for the identification of recombinant erythropoietins (i. e. epoetins) and analogues (e.g. darbepoetin and methoxypolyethyleneglycol-epoetin beta)*. **2009**.
- 10) Lasne, F.; De Ceaurriz. *Recombinant erythropoietin in urine*. Nature. **2000**.
- 11) Leuenberger, N.; Reichel, C.; Lasne, F. *Detection of erythropoiesis-stimulating agents in human anti-doping control: past, present and Future*. Bioanalysis. **2012**.
- 12) Alegre, A.; García-Sanz, R.; Giraldo, P.; Remacha, A. F.; de la Rubia, J.; Steegmann, J. L. *Eritropoyetina en Hematología*. Ed. Médica Panamericana, España, **2005**.
- 13) Pascual, J.A.; Belalcazar, V.; De Bolos, C.; Gutiérrez, R.; Llop, E.; Segura, J. *Recombinant erythropoietin and analogues: a challenge for doping control*. Ther Drug Monit, Volume 26, Number 2, April, **2004**.
- 14) Fiorentino Gómez Susana. *La inmunología en el diagnóstico clínico*. Centro Editorial Javeriano. **1994**.
- 15) Óscar Andrés Peñuela B.; Lina Andrea Gómez R. *Eritropoyetina: más allá de la proliferación y maduración eritroide*. rev.fac.med vol.18 no.1 Bogotá January/June, **2010**.
- 16) Parham Peter. *Inmunología*. 2ª Edición. Ed. Médica Panamericana, Argentina, **2006**.



- 17) Buemi, M.; Aloisi, C.; Cavallaro, E.; Corica, F.; Floccari, F.; Grasso, G.; Lasco, A.; Pettinato, G.; Ruello, A.; Sturiale, A.; Frisina, N. *Recombinant human erythropoietin (rHuEPO): more than just the correction of uremic anemia*. J. Nephrol., 15, 97-103. **2002**.
- 18) Cheung, W. K.; Goon, B. L.; Guilfoyle, M. C.; Wacholtz, M. C. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin after single and multiple subcutaneous doses to healthy subjects*. Clin. Pharmacol. Ther. 64, 412-423. **1998**.
- 19) Eckardt, K. U.; Kurtz, A. *Regulation of erythropoietin production*. Eur. J. Clin. Invest, 35 Suppl 3, 13-19. **2005**.
- 20) Jelkmann, W. *Molecular biology of erythropoietin*. Intern. Med., 43, 649-659. **2004**.
- 21) López Calbet, J. A. *Fisiología del Ejercicio. Fisiología de la altitud y ejercicio físico*. Ed. Médica Panamericana, Argentina, 696-737. **2006**.
- 22) Neumayer, H. H.; Brockmoller, J.; Fritschka, E.; Roots, I.; Scigalla, P.; & Wattenberg, M. *Pharmacokinetics of recombinant human erythropoietin after SC administration and in long-term IV treatment in patients on maintenance hemodialysis*. Contrib. Nephrol., 76, 131-141. **1989**.
- 23) Parisotto, R.; Gore, C. J.; Emslie, K. R.; Ashenden, M. J.; Brugnara, C.; Howe, C.; Martin, D. T.; Trout, G. J.; Hahn, A. G. *A novel method utilising markers of altered erythropoiesis for the detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes*. Haematologica, 85, 564-572. **2000**.
- 24) Pérez Ruiz, M. *Fisiología del Ejercicio. Serie Roja*. Ed. Médica Panamericana, Argentina, 281-94. **2006**.
- 25) Lasne, F. *Double-blotting: a solution to the problem of non-specific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures*. J. Immunol. Methods, 253, 125-131. **2001**.
- 26) Lasne, F.; Martin, L.; Nathalie, C.; Jacques de Ceaurriz, J. *Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones*. Anal. Biochem., 311, 119-126. **2002**.
- 27) Dongmi, C.; Myungsoo, K.; Jongsei, P. *Erythropoietin: physico and biochemical analysis*. J. of Chromatog. B, 687, 189-199. **1996**.
- 28) Giménez, E.; De Bolós, C.; Belalcazar, V.; Andreu, D.; Borrás, E.; De la Torre, B. G.; Barbosa, J.; Segura, J.; Pascual, J. A. *Anti-EPO and anti-NESP antibodies raised against synthetic peptides that reproduce the minimal amino acid sequence differences between EPO and NESP*. Anal Bioanal Chem. April, **2007**.
- 29) Reichel, C.; Reihlen P. WADA, *Technical Note on the performance of SDS/SAR – PAGE for the detection of EPO - doping*.



- 30) Cabrera García L.; Ruiz Antorán B.; Sancho López A. *Eritropoyetina: revisión de sus indicaciones*. Inf Ter Sist Nac Salud, Volumen 33, N° 1, **2009**.
- 31) WADA. *International Standard for Laboratories (ISL)*. **2015**.
- 32) WADA. *World Antidoping Code*. **2015**.
- 33) Vega Rodríguez, G. *Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos*. Comisión de control analítico y ampliación de cobertura. **2011**.
- 34) Política de Calidad del Laboratorio Nacional de Prevención y Control del Dopaje CONADE.
- 35) NORMA MEXICANA NMX-EC-17025-IMNC-2006. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. Instituto Mexicano de Normalización y Certificación A.C. **2006**.
- 36) Ficha técnica de Darbepoetina alfa. Aranesp®.
- 37) Ficha técnica de Epoetina alfa. Eprex®.
- 38) Ficha técnica de Epoetina delta. Dynepo®.
- 39) Ficha técnica de Epoetina omega. Hemax®.
- 40) Ficha técnica de Eritropoyetina pegilada (CERA). Mircera®.
- 41) Ficha técnica del Péptido sintético pegilado. Hematide®.
- 42) <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/antibodies/prestige-antibodies/prestige-antibodies-in-western-blot.html>
- 43) Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell. Instruction Manual. BIO-RAD.
- 44) Overview of results reported by the 31 IOC/WADA-accredited Laboratories. WADA Statistics 2003, Disponible en: [https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f\[0\]=field_topic%3A129](https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f[0]=field_topic%3A129)
- 45) Overview of results. 2004 Adverse Analytical Findings Reported by Accredited Laboratories. WADA Statistics 2004, Disponible en: [https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f\[0\]=field_topic%3A129](https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f[0]=field_topic%3A129)
- 46) Overview of results. 2005 Adverse Analytical Findings Reported by Accredited Laboratories. WADA Statistics 2005, Disponible en: [https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f\[0\]=field_topic%3A129](https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f[0]=field_topic%3A129)
- 47) Overview of results. 2006 Adverse Analytical Findings Reported by Accredited Laboratories. WADA Statistics 2006, Disponible en: [https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f\[0\]=field_topic%3A129](https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f[0]=field_topic%3A129)



- 48) Overview of results. 2007 Adverse Analytical Findings Reported by Accredited Laboratories. WADA Statistics 2007, Disponible en: [https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f\[0\]=field+topic%3A129](https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f[0]=field+topic%3A129)
- 49) Overview of results. 2008 Adverse Analytical Findings and Atypical Findings Reported by Accredited Laboratories. WADA Statistics 2008, Disponible en: [https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f\[0\]=field+topic%3A129](https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f[0]=field+topic%3A129)
- 50) Overview of results. 2009 Adverse Analytical Findings and Atypical Findings Reported by Accredited Laboratories. WADA Statistics 2009, Disponible en: [https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f\[0\]=field+topic%3A129](https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f[0]=field+topic%3A129)
- 51) Overview of results. 2010 Adverse Analytical Findings and Atypical Findings Reported by Accredited Laboratories. WADA Statistics 2010 Disponible en: [https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f\[0\]=field+topic%3A129](https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f[0]=field+topic%3A129)
- 52) Overview of results. 2011 Laboratory Testing Figures Reported by Accredited Laboratories. WADA Statistics 2011, Disponible en: [https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f\[0\]=field+topic%3A129](https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f[0]=field+topic%3A129)
- 53) 2012 Anti-Doping Testing Figures Reported. WADA Statistics 2012 Disponible en: [https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f\[0\]=field+topic%3A129](https://www.wada-ama.org/en/resources/search?f[0]=field+topic%3A129)
- 54) 2013 Anti-Doping Testing Figures Reported. WADA Statistics 2013 Disponible en: <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA-2013-Anti-Doping-Testing-Figures-LABORATORY-REPORT.pdf>

ANEXO 1

Criterios de evaluación de resultados

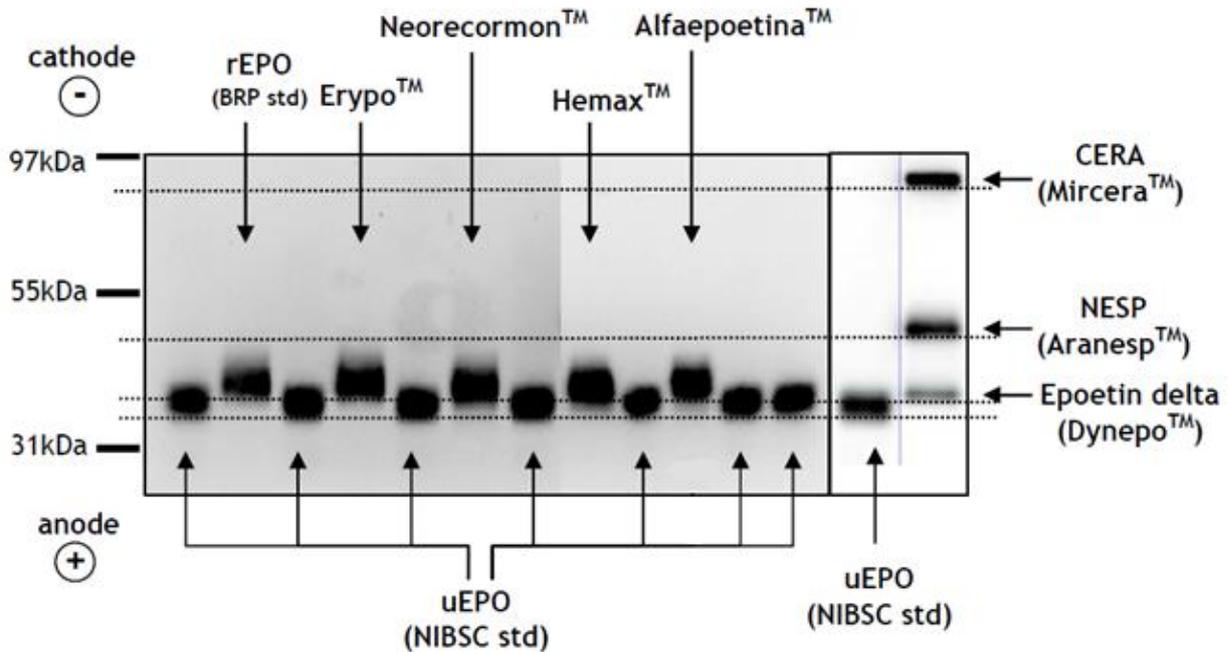


Figura 1. Ejemplo de una imagen obtenida para diferentes **disoluciones control** (rEPO BRP: patrón de rEPO alfa y beta; uEPO NIBSC std (patrón de eritropoyetina humana en orina), **biosimilares** (Erypo™, Neorecormon™, Hemax™ y alfaepoetina™) y **sustancias análogas** como MIRCERA (Mircera™) y NESP (Aranesp™), tras la aplicación del procedimiento de SDS-PAGE.

En aplicación del documento técnico de la WADA TD2014EPO, los parámetros a tener en cuenta para la evaluación de resultados serán los siguientes:

1. Características de migración: cada sustancia (representada en una banda), tendrá una posición y forma de banda (ancha, definida o difusa) que estará determinada por su carga y tamaño. Esta propiedad se puede utilizar para confirmar la identidad y/o la presencia de una sustancia exógena (**ver Figura 1**).
2. El centro de gravedad o los límites de la anchura de la banda se pueden utilizar para cerciorarse de que su posición difiere de la posición de la banda del patrón de uEPO que se ha incluido en el análisis (**ver Figura 1**).



ANEXO 2

Criterios de aceptación de resultados

La identificación de la presencia de bandas, así como de sus intensidades relativas, se hará visualmente de forma cualitativa (con la ayuda de las aplicaciones informáticas adecuadas para visualizar imágenes, particularmente ImageGauge y GASepo).

1. rEPO y biosimilares:

Presencia de una banda ubicada en la zona de migración de la disolución control de rEPO, compatible con la posición de la muestra control de rEPO y diferente a la posición observada para la disolución control de uEPO y la muestra control negativa (ver Figura 1).

2. NESP

Presencia de una banda ubicada en la zona de migración de la disolución control de NESP (ver Figura 1).

3. MIRCERA

Presencia de una banda ubicada en la zona de migración de la disolución control de MIRCERA (ver Figura 1).

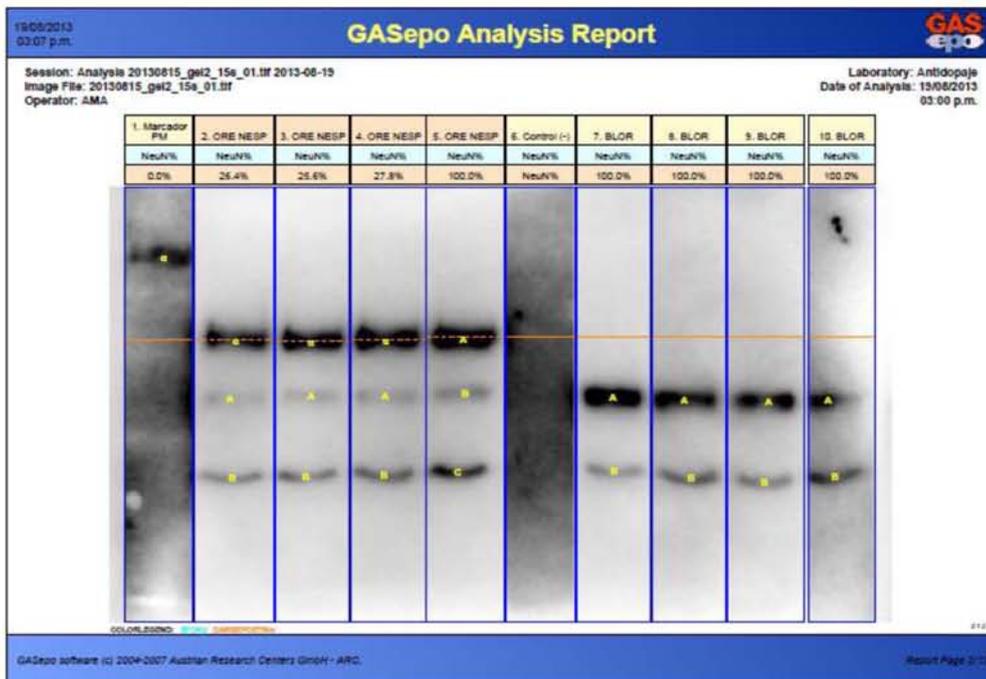
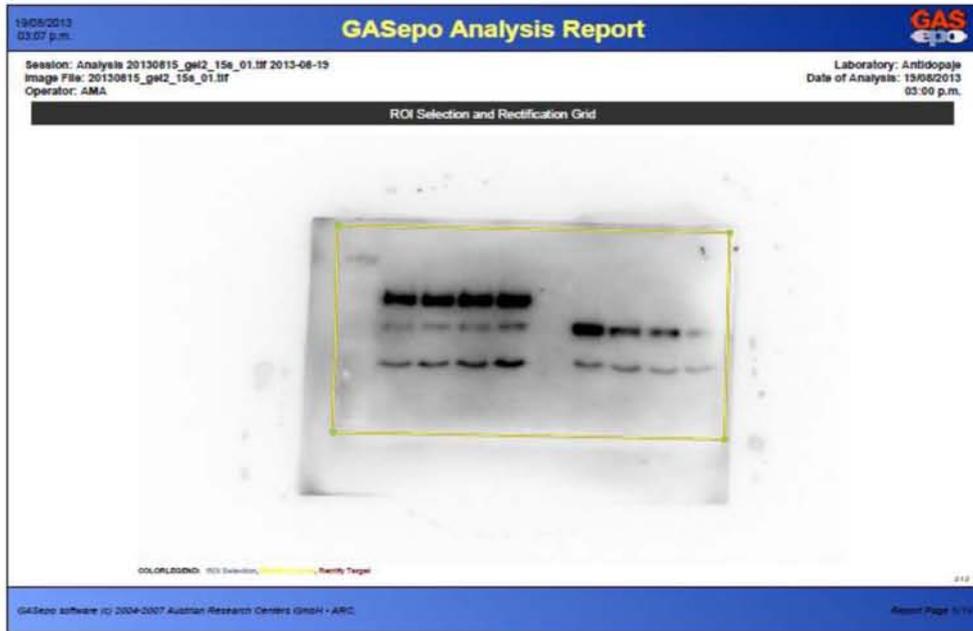
Artefactos como manchas o rasgaduras (*smear*), áreas de excesivo *background* o ausencia de señal, que interfieran significativamente con la evaluación de las bandas, invalidan el análisis.

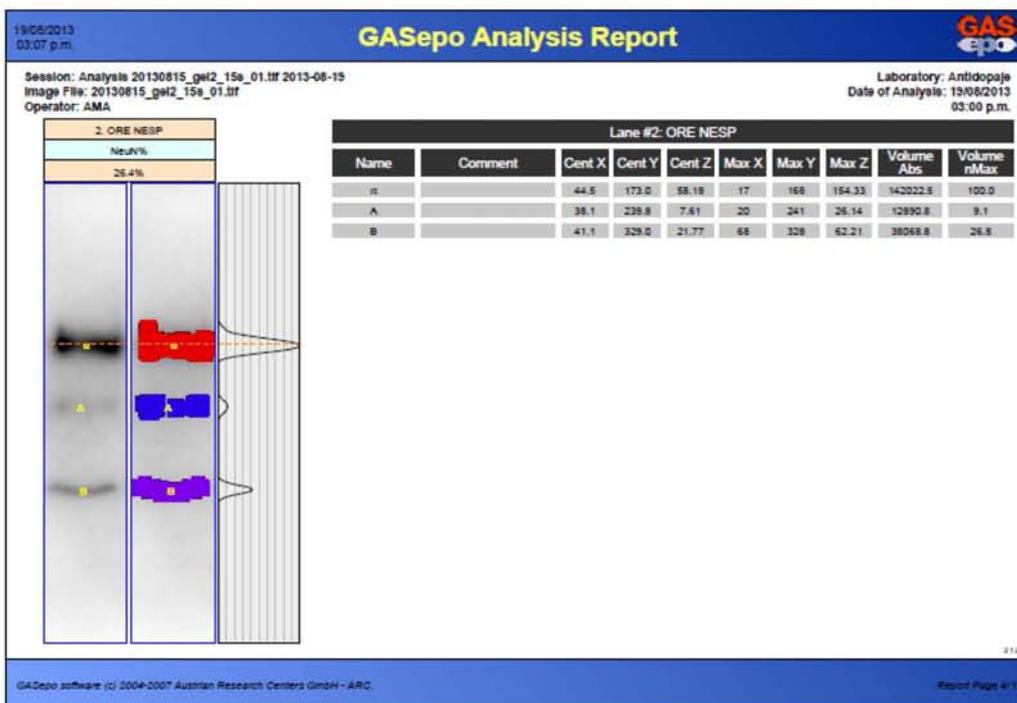
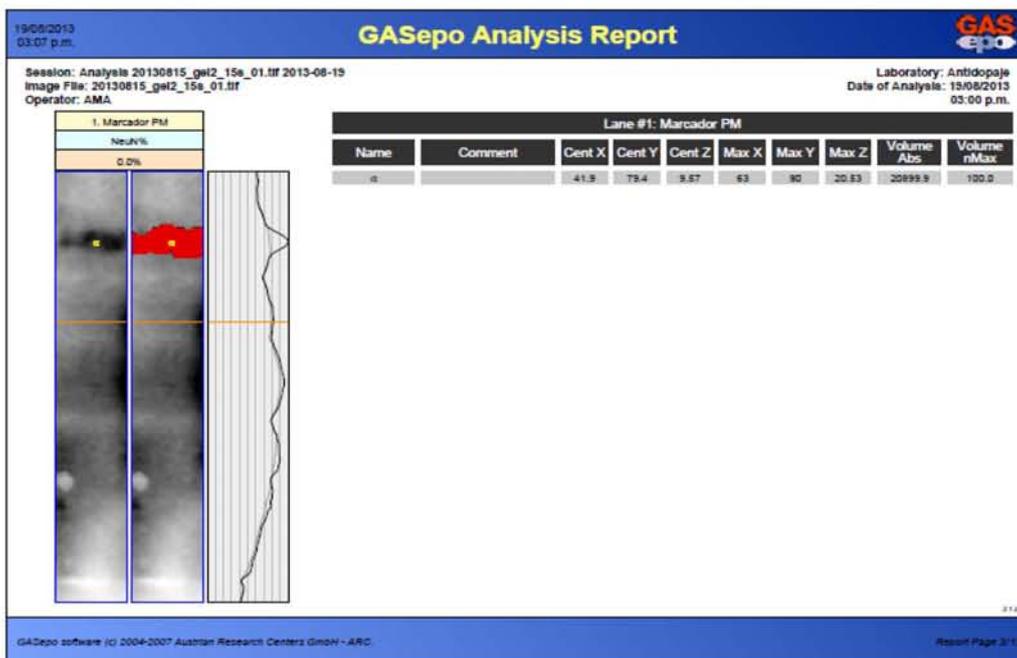
Las disoluciones control de MIRCERA, NESP y rEPO deberán migrar y ubicarse de acuerdo a sus propiedades proteicas, es decir en orden de migración deberá observarse la de mayor peso molecular, en este caso MIRCERA, seguido de NESP y finalmente rEPO. En caso de no observarse esta distribución, se anulará el lote de análisis.

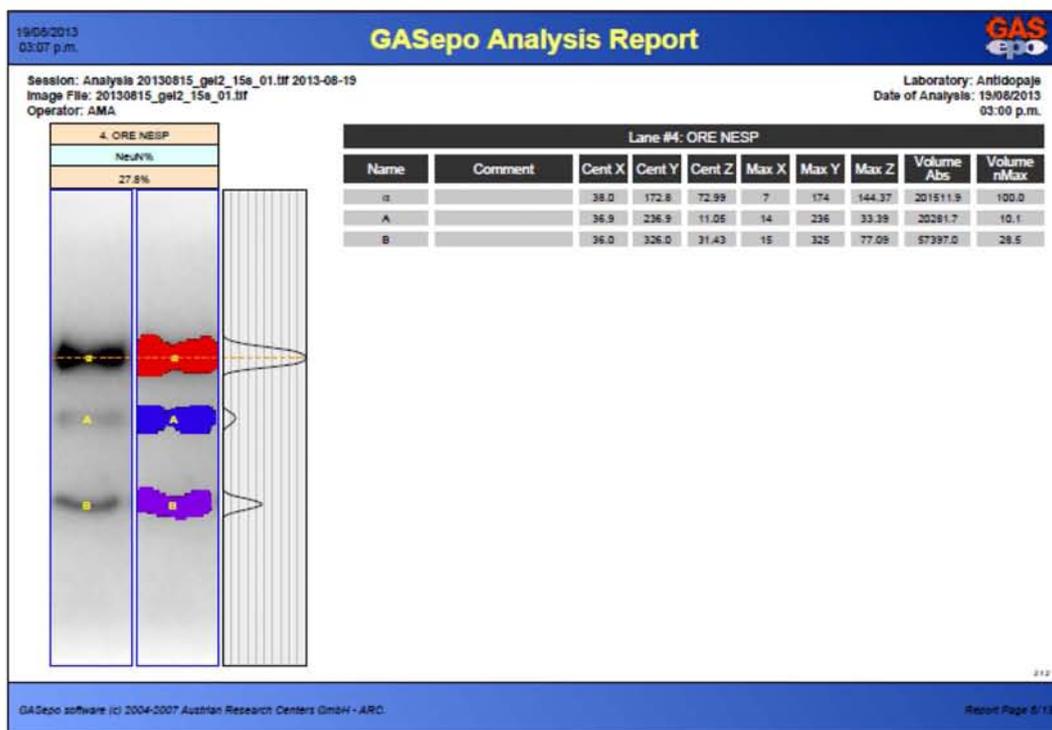
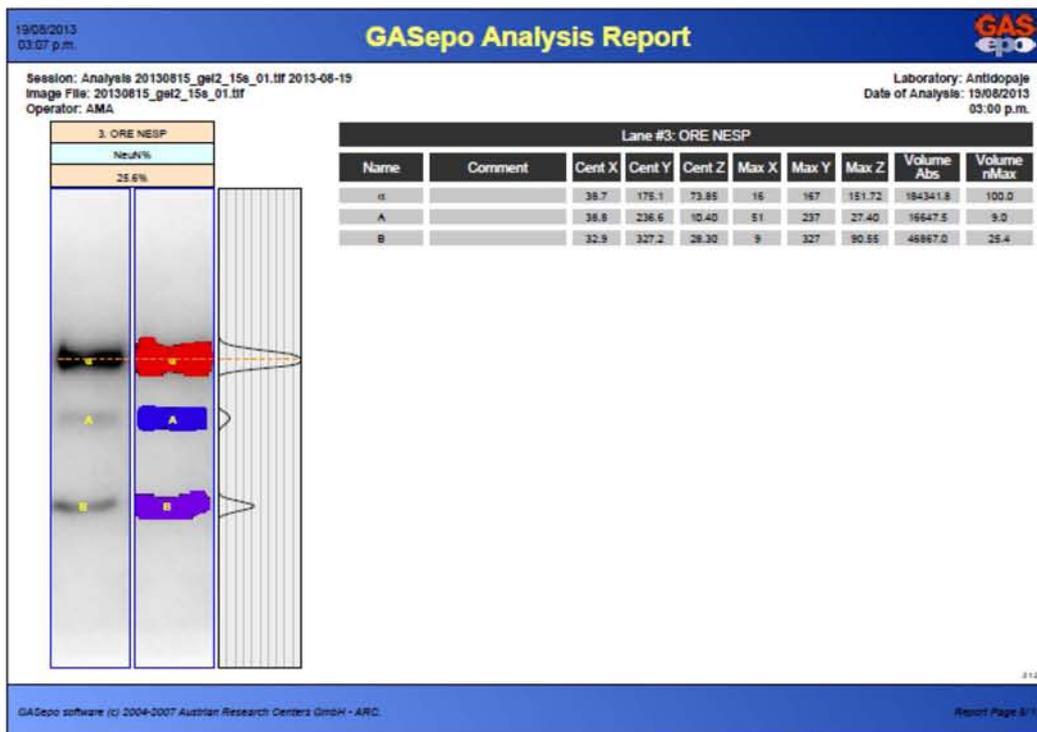
La presencia de artefactos electroforéticos a lo largo de la membrana, como aparición de dobles bandas o alteraciones en las formas de las bandas (bandas sonrisas o bandas rugosas), impedirán el análisis del lote.

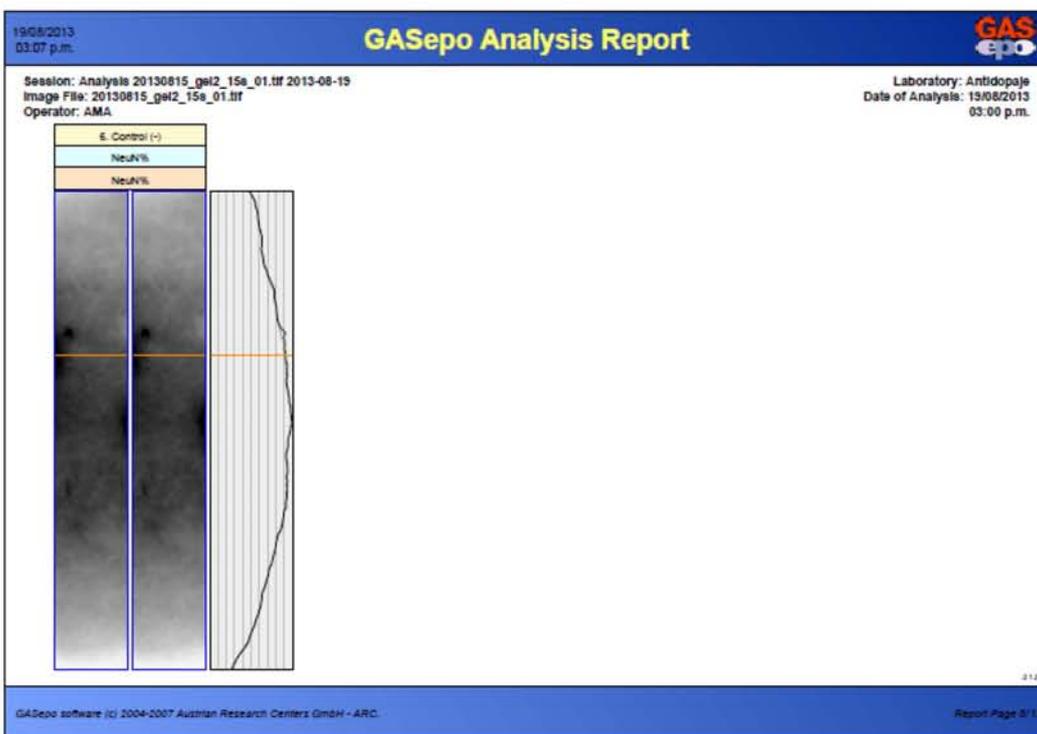
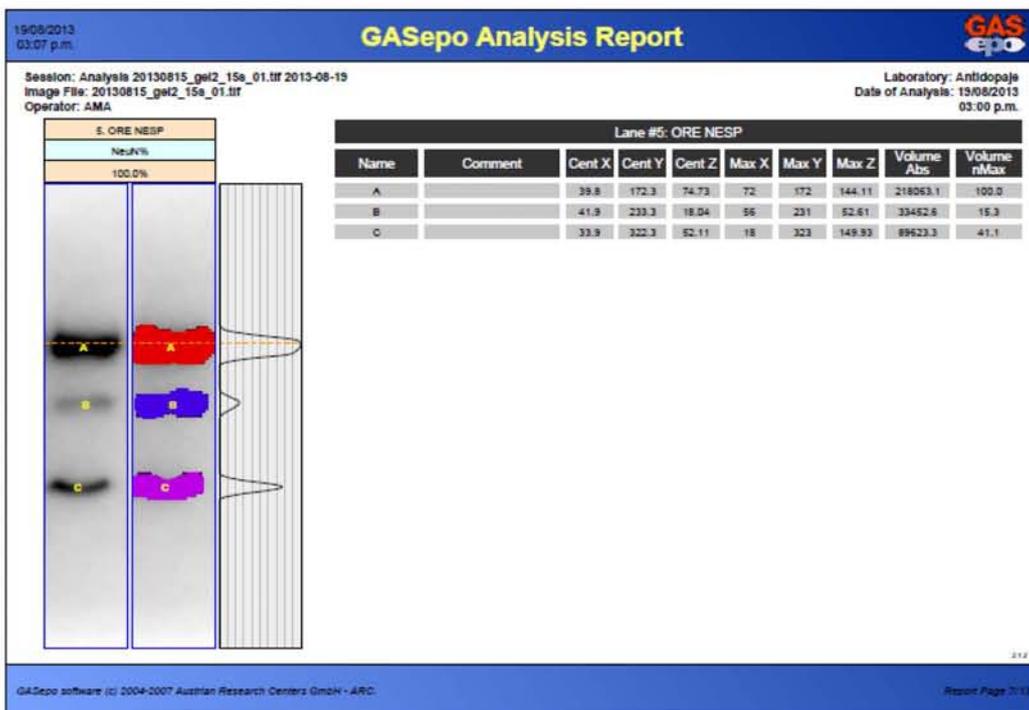
ANEXO 3

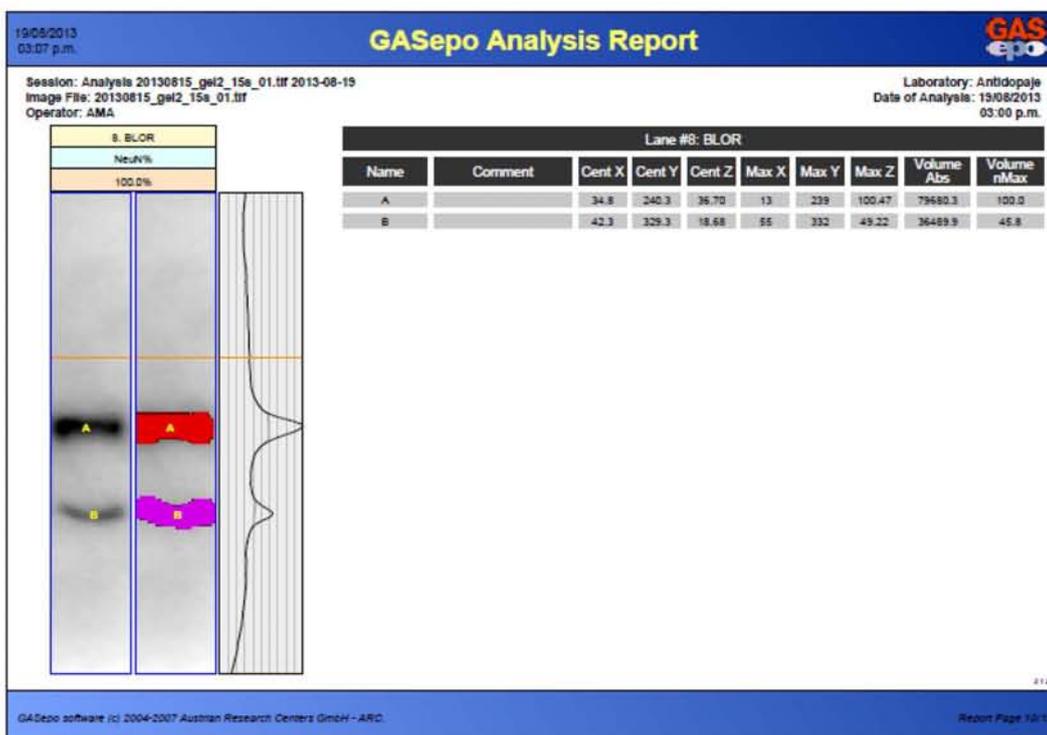
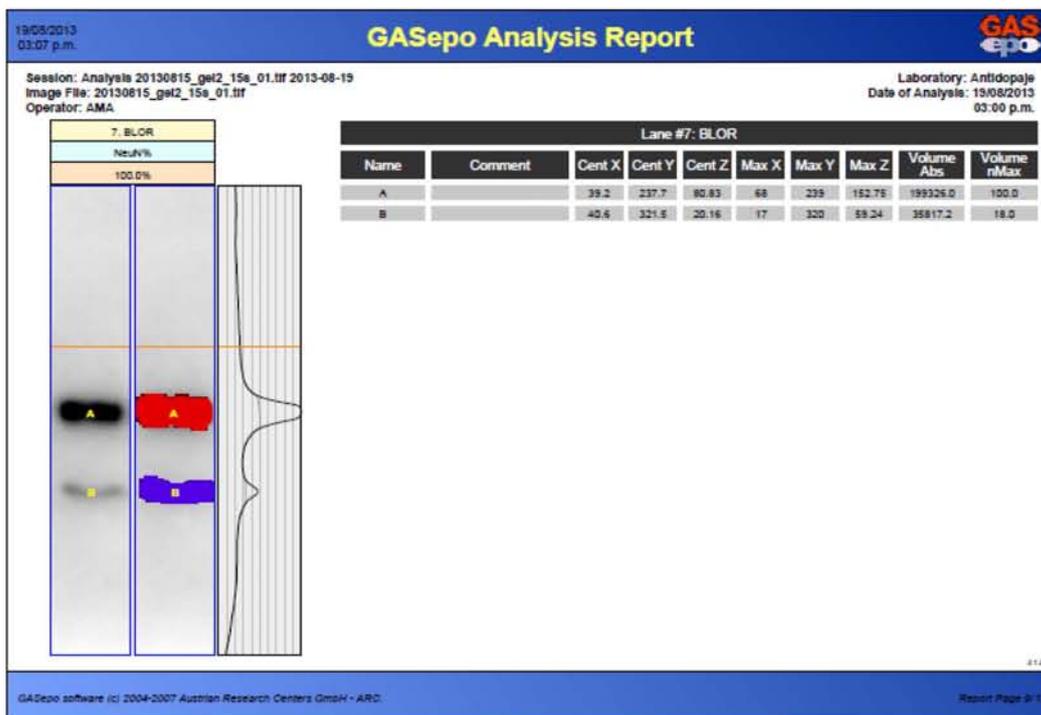
Ejemplo de un ensayo analizado por el programa GASepo (GASepo Core Versión 2.1.2. 15476)

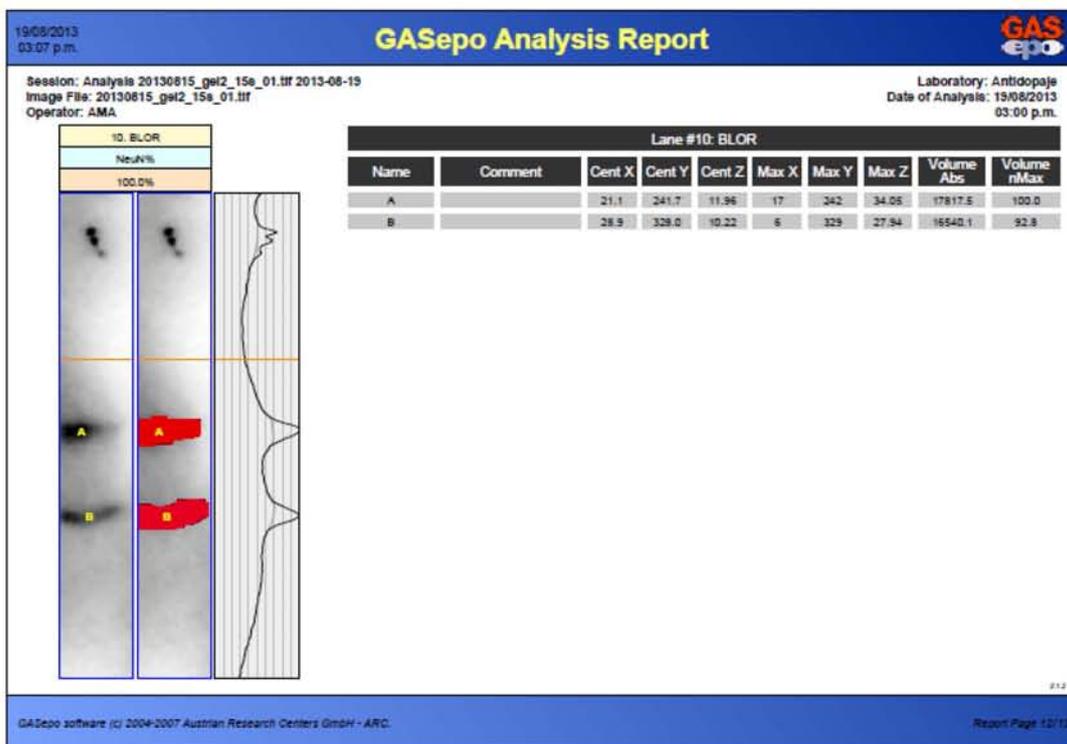
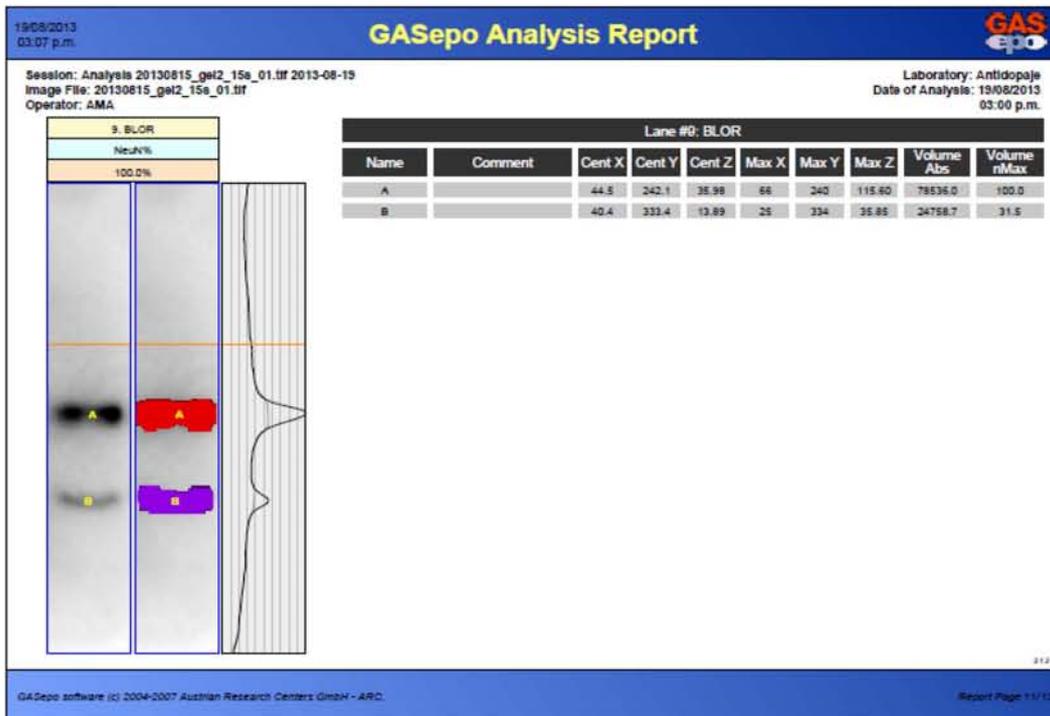














19/08/2013
03:07 p.m.

GASepo Analysis Report

GAS
epo

Session: Analysis 20130815_gel2_15s_01.tif 2013-08-19
Image File: 20130815_gel2_15s_01.tif
Operator: AMA

Laboratory: Antidopaje
Date of Analysis: 19/08/2013
03:00 p.m.

Lane ID	Sample ID	Conc.	% EPO $\alpha\beta$	% DAR $\beta\alpha$	Comment
1. Marcador PM	V027EC-001	–	NeuN	0.0	Sigma
2. ORE NESP	Lote 04	–	NeuN	26.4	
3. ORE NESP	Lote 04	–	NeuN	25.6	
4. ORE NESP	Lote 04	–	NeuN	27.8	
5. ORE NESP	Lote 04	–	NeuN	100.0	
6. Control (-)	Agua	–	NeuN	NeuN	
7. BLOR	AMA	–	NeuN	100.0	
8. BLOR	AMA	–	NeuN	100.0	
9. BLOR	AMA	–	NeuN	100.0	
10. BLOR	AMA	–	NeuN	100.0	

2/2

GASepo software (c) 2004-2007 Austrian Research Centers GmbH - ARC. Report Page 13/13



ANEXO 4

Preparación de geles para SDS-PAGE

Las cantidades de reactivos por agregar para la preparación de los geles dependerán de la tabla 1 y 2.

Tabla 1. Gel separador

No. de geles	1	2	3	4	5	6
Agua Milli-Q	2	4	6	8	10	12
Bisacrilamida	1.65	3.3	4.95	6.6	8.25	9.9
TRIS 1.5 M pH 8.8	1.25	2.5	3.75	5	6.25	7.5
SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3
AP 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012

Tabla 2. Gel concentrador

No. de geles	1	2	3	4	5	6
Agua Milli-Q	1.4	2.8	4.2	5.6	7	8.4
Bisacrilamida	0.33	0.66	0.99	1.32	1.65	1.98
TRIS 0.5 M pH 6.82	0.25	0.5	0.75	1	1.25	1.5
SDS 10%	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.12
AP 10%	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.12
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012

Nota: Las cantidades se encuentran en mL.

- Tomar un matraz para vacío con tapa de rosca de 125 mL y rotularlo con la siguiente información:
 - Gel separador
 - Iniciales de la persona que lo prepara
- Añadir agua calidad Milli-Q, bisacrilamida, TRIS 1.5 M pH 8.8 y SDS según las cantidades correspondientes al número de geles que se desean preparar (Tabla 1).
- Colocar el matraz sobre el agitador magnético e introducir la barra magnética.
- Conectar al matraz la bomba de vacío y desgasificar la disolución por 15 min en agitación constante.



5. Armado del gel.
 - 5.1. Asegurarse de que las placas de vidrio, los peines y los soportes grises de goma para el casete, estén limpios, libres de grasa y completamente secos.
 - 5.2. Abrir las pinzas del marco de ensamble del gel.
 - 5.3. Sostener la placa con separadores de forma que la marca UP, quede hacia arriba y se pueda leer correctamente.
 - 5.4. Colocar la placa de vidrio corta sobre la placa con separadores.
 - 5.5. Deslizar las dos placas dentro del marco de ensamble, manteniendo la placa corta hacia el frente. Asegurarse de que ambas placas queden niveladas sobre una superficie plana.
 - 5.6. Cuando las placas estén dentro del marco, asegurarlas con las pinzas de presión frontales empujando las pinzas hacia afuera. Verificar que ambas placas estén perfectamente alineadas en la parte inferior.
 - 5.7. Colocar el soporte gris de goma en el soporte de ensamble.
 - 5.8. Colocar el marco de ensamble sobre el soporte gris de goma y asegurarlo con la pinza superior del soporte de ensamble. La marca UP quedará nuevamente legible para el usuario.
 - 5.9. Una vez armado el casete, colocar un peine en medio de las dos placas de vidrio y marcar la placa 1 cm por debajo de los dientes del peine, este será el nivel que deberá alcanzar el gel separador.
6. Retirar la disolución de la bomba de vacío y agregar el AP 10% y el TEMED según las cantidades correspondientes al número de geles que se desean preparar (Tabla 1).
7. Agitar moderadamente el matraz para homogenizar la disolución.
8. Vaciar de manera suave y constante la disolución para la preparación del gel separador, evitando la formación de burbujas de aire.
9. Inmediatamente agregar lentamente sobre la disolución del gel separador, agua calidad Milli-Q para evitar la formación de meniscos en el gel.
10. Permitir la polimerización del gel.
11. Tomar un matraz para vacío con tapa de rosca de 125 mL y rotularlo con la siguiente información:
 - Gel concentrador
 - Iniciales de la persona que lo prepara
12. Añadir agua calidad Milli-Q, bisacrilamida, TRIS 0.5 M pH 6.82 y SDS según las cantidades correspondientes al número de geles que se desean preparar (Tabla 2).
13. Colocar el matraz sobre el agitador magnético e introducir la barra magnética.



14. Conectar al matraz la bomba de vacío y desgasificar la disolución por 15 min en agitación constante.
15. Retirar la disolución de la bomba de vacío y agregar el AP 10% y el TEMED según las cantidades correspondientes al número de geles que se desean preparar (Tabla 2).
16. Agitar moderadamente el matraz para homogenizar la disolución.
17. Secar la superficie del gel separador con un papel filtro antes de agregar el gel concentrador.
18. Agregar la disolución para preparar el gel concentrador entre las placas de vidrio hasta que la disolución alcance la parte superior de la placa corta.
19. Insertar el peine del tamaño adecuado según el número de muestras a analizar y el volumen de las muestras. El grosor del peine deberá corresponder con el tamaño de los separadores de los vidrios.
20. Asegurarse de que el peine quede bien insertado y alineado entre los separadores de la placa de vidrio.
21. Permitir la polimerización del gel concentrador.
22. Para optimizar la polimerización de los geles, colocarlos en una cámara húmeda hasta su empleo.