

ELABORACIÓN DE UN ESTÁNDAR SECUNDARIO DE FACTOR IX DE LA COAGULACIÓN

Romina Rodriguez, Anabella Marinsaldi, Marcela Martínez, Anabella Marcato, Ana Vilches, María Bernardi. LABORATORIO DE HEMODERIVADOS. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina

Introducción

La elaboración de concentrados de factores de la coagulación, requiere del empleo de estándares primarios para garantizar resultados confiables.

Para ello se utilizan Estándares Internacionales (EI) distribuidos por Organismos Internacionales, con disponibilidad limitada, cuya principal finalidad es emplearlos para calibrar Estándares Secundarios (ES).

En nuestro país, no se encuentran disponibles estándares primarios para la medición de factores de la coagulación, ni existen sustitutos. Además, es recomendable que en los ensayos biológicos comparativos, se aplique el principio "like vs like", es decir que estándar y muestra posean composiciones similares.

Objetivo

Elaborar un ES de factor IX de la coagulación (FIX), con una composición similar a la del EI y evaluar su estabilidad en el tiempo, para ser utilizado en ensayos de rutina.

Materiales y métodos

Se elaboró un ES a partir de una solución concentrada de FIX, la que fue diluida con buffer Citrato de Sodio 20 mM, NaCl 0.15 M, Lisina 0.1g%, Arginina 0.35g%, pH 7,4. Luego la solución fue fraccionada, envasada asépticamente y liofilizada. Cada vial fue reconstituido con 1 ml de agua calidad inyectable (AI).

Como EI, se utilizó el *4th International Standard Blood coagulation Factor IX Concentrate, Human 07/182* (7,9 UI FIX/ampolla). Cada ampolla fue reconstituida con 1 ml de AI.

El ES fue analizado por método coagulométrico frente al EI de acuerdo al descrito en Farmacopea Europea (FE), en dos laboratorios diferentes, realizando una predilución con plasma carente de FIX.

En cada laboratorio se reconstituyeron 2 (dos) ampollas de ES y se analizaron como pool en cada ensayo.

Se realizaron 4 (cuatro) ensayos independientes y se aplicó el modelo estadístico de líneas paralelas para calcular la potencia. El valor final del ES se obtuvo por combinación de los ensayos válidos, utilizando el software Combistat de FE (versión 5.0).

Para evaluar la estabilidad, los viales del ES fueron conservados a -70°C y periódicamente se analizó el FIX, hasta completar los 7 meses.

Resultados

En la siguiente tabla se muestran los resultados de los ensayos realizados por cada laboratorio para asignar la potencia del ES

Resultados de Ensayos individuales

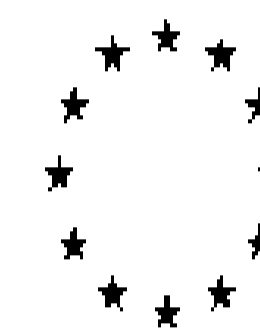
Factor IX	Laboratorio 1		Laboratorio 2	
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4
UI/ml	5,4	4,8	5,9	5,0
IC (%)	78 - 128	89 - 112	93 - 108	90 - 112
IC (UI/ml)	4,2 - 6,9	4,2 - 5,4	5,4 - 6,3	4,5 - 5,5

La potencia obtenida para el ES fue de 5.3 UI/ml con un Intervalo de Confianza entre 4.9 y 5.6 UI/ml (94 y 107%)

Plantilla Combistat. Asignación de Potencia de ES

Combistat Version 5.0. Tuesday, 27 August 2019, 11:11:48 [-03:00], Page 1 of 1

Substance	Factor IX	Remarks: Asignacion Potencia ESFIX1801
Method	Coagulométrico	
Date of assay	31/10/2018	
Ass. pot.	7.27000 UI/ml	



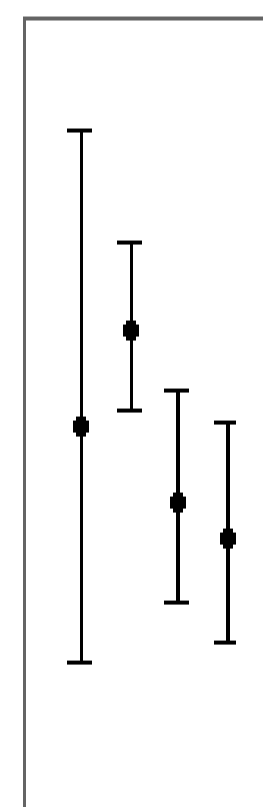
Assay number	Technician	Sample	Info	Lower limit	Estimate	Upper limit	dl
1	AM	1	ESFIX1801	4.15532	5.36080	6.86534	6
1	AM	1	ESFIX1801	5.43856	5.84933	6.29180	6
2	AM	1	ESFIX1801	4.45605	4.97498	5.54488	6
2	RR	1	ESFIX1801	4.24976	4.78436	5.37450	6

Geometric combination
Homogeneity: p = 0.001

Weighted combination			
(UI/ml)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	5.15313	5.38770	5.63295
Rel. to Ass.	70.9%	74.1%	77.5%
Rel. to Est.	95.6%	100.0%	104.6%

Semi-weighted combination			
(UI/ml)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	4.93672	5.27377	5.63383
Rel. to Ass.	67.9%	72.5%	77.5%
Rel. to Est.	93.6%	100.0%	106.8%

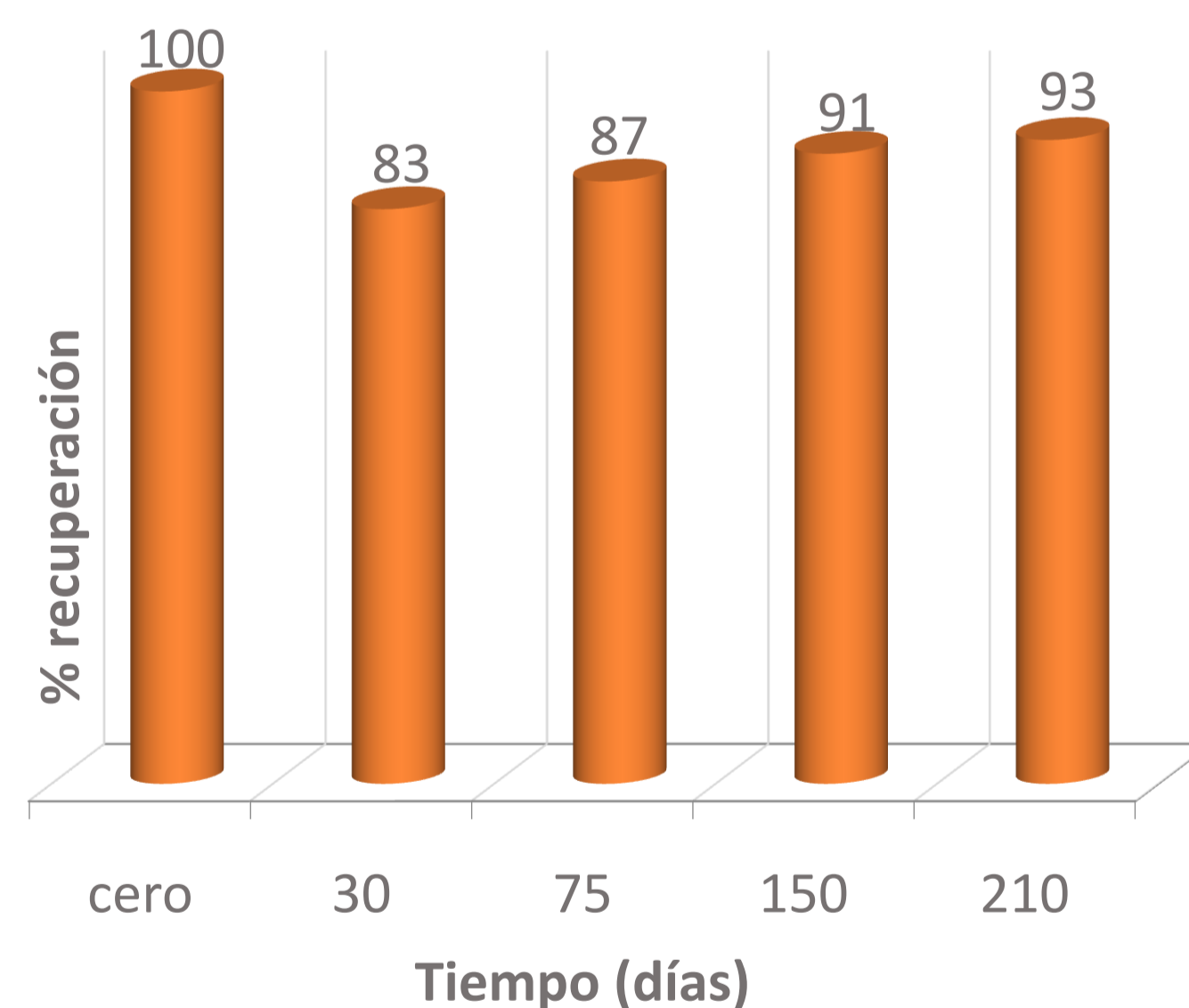
Unweighted combination			
(UI/ml)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	4.53932	5.22682	6.01845
Rel. to Ass.	62.4%	71.9%	82.8%
Rel. to Est.	86.8%	100.0%	115.1%



Si el p-valor es menor que 0.100 los intervalos de confianza tienden a ser heterogéneos y sería mejor utilizar la combinación semi-ponderada

Los resultados de estabilidad fueron satisfactorios, recuperando un 93% de FIX, luego de 7 meses a -70°C. (Gráfico 1)

Gráfico 1: % Recuperación de FIX



Conclusión

Los resultados obtenidos nos permiten disponer de un ES adecuado para utilizarlo en los ensayos de rutina durante la elaboración de concentrado de factor IX de la coagulación teniendo en cuenta el principio "like vs like" y contribuir a mejorar la disponibilidad de los EI

Bibliografía

Farmacopea Europea 9na Edición

Daas A. The CombiStats User Manual. 2011;(January):1-53.

Roberts G, Wilmot H, Dougall T, Rigsby P, Gray E. Calibration of the 7th British Working Standard for factors II, IX and X, concentrate. Biologicals [Internet]. Elsevier; 2018;56(Febuary):63-6.

Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2018.08.007>

Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards (revised 2004). WHO Tech Rep Ser No 932, 2006. 2006;(932):73-131.