ESTANDARIZACION Y VALIDACION DE LA TECNICA LISIS DEL COAGULO PARA LA DETERMINACION DE LA POTENCIA DE LA ESTREPTOQUINASA RECOMBINANTE

Yamila Martínez, Neivis Marrero y Mercedes Ortega

Subdirección de Calidad, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana 6, C.P. 10600, Cuba

Recibido en noviembre de 1993. Aprobado en febrero de 1994

Key words: Fibrinolysis, streptokinase, fibrinogen, plasminogen, euglobulin fraction

SUMMARY

The clot lysis technique used to determine potency in recombinant streptokinase is described in the British Pharmacopeia, 1988. The standardization of the clot lysis technique is shown as well as its validation. Assays were carried out to evaluate the influence of the thrombin from two species on the determination of biological activity in recombinant streptokinase. Accuracy was evaluated by recovering assay and precision was determined by the coefficient of variation intra and interassay. It was concluded that it is possible to use bovine thrombin at 30 IU instead of human at 20 IU and the accuracy and precision of the technique are satisfactory.

RESUMEN

La técnica de la Lisis del coágulo utilizada en la determinación de la potencia de la estreptoquinasa recombinante aparece descrita en la Farmacopea Británica de 1988. En este trabajo se muestra la estandarización de la lisis del coágulo y la validación de esta técnica. Para ello se evaluó la influencia que puede ejercer la trombina de dos especies en la determinación de la actividad de la estreptoquinasa. Se evaluó la exactitud mediante un análisis de recobrado y la precisión se evaluó determinando los coeficientes de variación intra e interensayo. Se concluyó que se puede sustituir la trombina humana a 20 UI por trombina bovina a 30 UI y que la exactitud y precisión de la técnica son satisfactorias para el propósito que se persigue.

INTRODUCCION

El creciente desarrollo en la obtención de proteínas de interés médico e industrial producidas por la tecnología del ADN recombinante requiere de métodos analíticos de control confiables según se establecen en las Buenas prácticas de manufactura de la Organización Mundial de la Salud (1991); por lo que es imprescindible la validación de los métodos de análisis. En el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología se ha obtenido la estreptoquinasa por vía recombinante, producto que posee un marcado efecto farmacológico en la terapia trombolítica. Es necesario por tanto, disponer de métodos confiables reconocidos internacionalmente que permitan determinar la actividad biológica de esta proteína.

La técnica de la lisis del coágulo utilizada en la determinación de la potencia de la estreptoquinasa recombinante aparece descrita en la Farmacopea Británica de 1988, esta técnica se basa en la capacidad de la estreptoquinasa para activar el plasminógeno humano mediante la formación de un complejo equimolar estreptoquinasa-plasminógeno que cataliza la conversión del plasminógeno en plasmina. De este modo se activa la fibrinolísis, que conlleva la degradación de los coágulos de fibrina y del fibrinógeno.

En el método se compara la capacidad para activar el plasminógeno humano que muestra la preparación a analizar con respecto a una preparación estándar de potencia conocida. La plasmina generada se determina por medición del tiempo de lisis de los coágulos de fibrina bajo las condiciones del ensayo realizadas.

MATERIALES Y METODOS

El procedimiento de la lisis del coágulo es el recomendado en la Farmacopea Británica 1988 (BP 1988)(2). Las proteínas que constituyen el sustrato principal de la técnica, el plasminógeno y el fibrinógeno, son introducidas en forma de fracción euglobulínica. Esta fracción se preparó siguiendo el procedimiento recomendado (2). El material de referencia utilizado fue el segundo estándar internacional para estreptoquinasa 88/826, establecido en 1989. Se utilizó trombina humana (Sigma, E.U), trombina bovina (Sigma) y albúmina bovina fracción V (BSA). La muestra control del ensayo fue una preparación de estreptoquinasa recombinante obtenida del proceso de producción en el CIGB y cuya actividad biológica expresada en unidades internacionales se certificó contra el segundo estándar internacional para estreptoquinasa mediante la lisis del coágulo.

Procedimiento para la realización de la lisis del coágulo.

Se prepararon diluciones primarias y sucesivas de la preparación estándar de estreptoquinasa de potencia conocida y de las muestras a ensayar. Los valores de potencia finales fueron 2.25 UI/mL; 3.375 UI/mL y 5.062 UI/mL (estos tres valores de potencia deben cumplir que el comportamiento de la curva dosis-respuesta sea lineal). Se ensayaron cuatro réplicas de cada una de las potencias

Copyright © 1994, Sociedad Iberolatinoamericana de Biotecnología Aplicada a la Salud
La Habana, Cuba

seleccionadas utilizando tampón citro-fosfato (0.2 M de hidrógeno fosfato de sodio y 0.1 M de ácido cítrico) pH 7.2 con un 3% de BSA. Las muestras se mantuvieron a una temperatura de 4°C en hielo, usándose dentro de las seis horas siguientes a su preparación. En tubos de ensayos de 1 cm de diámetro mantenidos a una temperatura de 37°C se añadieron sucesivamente: 0.2 mL de la preparación estándar de estreptoquinasa o de la muestra a ensayar, 0.2 mL del tampón citro-fosfato pH 7.2, 0.1 mL de solución de trombina y 0.5 mL de la solución fracción euglobulínica a 10 UI/mL y se midió el tiempo de formación del coágulo de fibrina y el tiempo de lisis del coágulo (en segundos). Se utilizó alternativamente trombina humana a 20 UI (2) o trombina bovina a 30 UI (10). Los resultados se procesaron utilizándo el análisis estadístico recomendado por la Farmacopea Británica de 1980.

Validación de la lisis del coágulo

Para la validación de esta técnica se evaluaron la exactitud y la precisión; la exactitud se evaluó mediante un análisis de recobrado adicionando a una cantidad determinada de la muestra patrón de potencia conocida diferentes cantidades de la muestra control de potencia conocida (se evalúa la actividad biológica total) y la precisión se evaluó determinando los coeficientes de variación intra e interensayo.

Análisis estadístico

Los valores de potencia obtenidos por el método Lisis del coágulo al usar las trombinas de diferentes especies se sometieron a un análisis estadístico utilizando la prueba de datos pareados con el estadígrafo "t" de Student, donde el nivel de significación fue de 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSION

Estándarización de la técnica para la determinación de la potencia de la Estreptoquinasa recombinante

Influencia de la trombina en la determinación de la potencia de la Estreptoquinasa recombinante

La técnica reportada (2) utiliza la trombina humana a 20 UI. Con el objetivo de reducir los costos de realización de la técnica se evaluó la sustitución de la trombina humana por trombina bovina. Se usó como muestra para estos ensayos la muestra control del ensayo que es una preparación de estreptoquinasa recombinante de potencia conocida. Los resultados obtenidos aparecen reflejados en la tabla 1.

Estos datos fueron sometidos al análisis estadístico descrito en la sección de Materiales y Métodos obteniéndose que la "t" calculada es menor que la "t" tabulada. Ello permite concluir que puede usarse trombina bovina a 30 UI en sustitución de trombina humana a 20 UI, sin que ello implique variación en los valores de potencia de las muestras a analizar.

Tabla 1

Valores de potencia de la muestra control (lote 2012) obtenidos, usando trombina humana a 20 UI y trombina bovina a 30 UI

Nº de la determinación	Trombina humana(UI)	Trombina Bovina(UI)
1era	391 000	388 000
2da	417 000	420 000
3ra	412 000	400 000
4ta	400 000	406 000
5ta	365 000	389 000
6ta	375 000	396 000

Validación de la Lisis del coágulo

Evaluación de la exactitud de la técnica

La exactitud no es más que el grado de coincidencia entre el valor medido y el real (1, 8, 9). La evaluación de este parámetro se realizó por un método de recobrado (5, 6). Para ello se escogieron dos preparaciones de estreptoquinasa recombinante de potencia conocida, el lote 3001 y el lote 2012 con las que se prepararon cuatro muestras diferentes, adicionando a una misma cantidad del lote 3001 cantidades diferentes del lote control 2012, y se evaluaron mediante la técnica Lisis del coágulo, en tres ensayos diferentes.

Tabla 2

Valores de potencia y por cientos de recobrado obtenidos en el ensayo de recuperación.

Muestra	Potencia Esperada (UI/mL)	Potencia Obtenida (UI/mL)	% de recobrado
R1	16 521	18 970	114.8
		19 014	115.1
		18 700	113.1
R2	27 119	30 482	112.4
		28 892	106.4
		29 363	108.3
R3	34 690	38 409	110.7
		32 959	95.01
		37 637	108.5
R4	40 368	46 567	115.4
		43 413	107.7
		42 992	106.5

Los resultados obtenidos aparecen en la tabla 2.

Los por cientos de recobrado obtenidos en cada uno de los casos oscilan entre 95% y 115%, valores que confirman la buena exactitud del método para el propósito que se persigue.

Evaluación de la precisión del método.

La precisión de un método se define como la dispersión de los datos obtenidos para una muestra procesada varias veces (1), (8), (9). En este trabajo la precisión se evaluó mediante los coeficientes de variación intraensayo e interensayo como criterio de repetibilidad y reproducibilidad, respectivamente (4, 7). Para evaluar la repetibilidad se escogió la muestra control del ensayo de potencia conocida y se evaluó por la Lisis del coágulo diez veces en el mismo ensayo en iguales condiciones. Se obtuvieron los resultados que aparacen en la tabla 3. Esta misma muestra se evaluó ocho veces en ensayos realizados diferentes dias en condiciones idénticas obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 4.

Si se tiene en cuenta las fuentes de variación que se presentan en esta técnica: medida de volúmenes de reactivos y muestras, reproducibilidad en la preparación de reactivos y determinación visual del tiempo de lisis del coágulo, los resultados obtenidos en la evaluación de la precisión del método pueden considerarse como satisfactorios (coeficientes de variación intra e interensayo inferiores al 5%).

Tabla 3
Valores de potencia obtenidos para el lote control 2012 en el ensayo de repetibilidad

Nº de la determinación	Potencia obtenida (UI)
1	415 000
2	396 000
3	418 000
4	415 000
5	419 000
6	413 000
7	398 000
8	412 000
9	425 000
10	400 000

X = 411 100 UI
S = 9780
C.V = 2.37%

Tabla 4
Valores de potencia obtenidos para el lote control 2012 en el ensayo de reproducibilidad.

Nº de la determinación	Potencia obtenida (UI)
1era	413 000
2da	428 000
3ra	388 000
4ta	420 000
5ta	415 000
6ta	426 000
7ma	382 000
8va	400 000

X = 409 000 UI
S = 17212
C.V = 4.20%

REFERENCIAS

1- AGUILAR, G. (1991). ¿Qué tanto sabe usted acerca de... seguridad y salud ocupacional?. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. **22(2)**.

2- British Pharmacopeia (BP) (1988). Appendix XIV E.

3- British Pharmacopeia (BP) (1980). Appendix XIV F, XIV O.

4- BUICK, A.R.; M.V. DOIG; S.C. JEAL; G.S. LAND y R.D. McDOWALL (1990). Method validation in the bioanalytical laboratory. Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis. **8(8-12)**:629-637.

5- DeSAIN, C. (1992). Master method validation protocols. BioPharm. June.

6- KARNES, H.T.; G. SHIU; V.P. SHAH (1991). Validation of bioanalytical methods. Pharmaceutical Research. **8**(4).

7- LAYLOFF, T. y P. MOTISE (1992). Selection and validation of legal reference methods of analysis for pharmaceutical products in the United States. Pharmaceutical Technology. September.

8- RAMPAZZO, P. (1990). Standardization and validation of analytical methods in the pharmaceutical industry. IL Farmaco. **45(6)**:807-815.

9- THIELMAN, K. (1973). Principios de metodología en Bioquímica clínica. Editorial Organismos.

10- WESTLUND, L. E. and L.O. ANDERSON (1991). Variables influencing the clot lysis assay of Streptokinase. Thrombosis Research. **64**:713-721.