

Alta variabilidad en la determinación del Factor IX en muestras de plasma adicionadas con nonacog beta pegol entre distintos pares de reactivos/sistemas de detección

► Cristina Duboscq^{1a*}, Emanuel Sueldo^{2b}, Claudio Rosa^{3c}, Mercedes Zirpoli^{4c}, José Ceresetto^{5a}, Alejandra Baques^{6b}, Mirta Arias^{7b}

¹ Dra. en Ciencias Químicas. (ORCID 0000-0002-0490-6972)

² Bioquímico. (ORCID 0000-000254662953)

³ Bioquímico. (ORCID 0000-000252474465)

⁴ Bioquímica.

⁵ Médico Hematólogo.

⁶ Médica Hematóloga.

⁷ Bioquímica. (ORCID 0000-0001-8498-6628).

^a Hospital Británico. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

^b Hospital Dr. César Milstein. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

^c Hospital Universitario Austral. Pilar, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

* Autora para correspondencia.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Resumen

La hemofilia B es un trastorno hemorrágico hereditario, ligado al cromosoma X, que se caracteriza por el déficit del factor IX (FIX) de la coagulación. Para mejorar la calidad de vida de los pacientes y la adherencia al tratamiento se han desarrollado concentrados de factores recombinantes modificados para extender su vida media, denominados factores de vida media extendida (EHL: *extended half life concentrates*). El nonacog beta pegol (N9-GP) es una molécula de FIX humano recombinante glicopegilada que tiene una vida media de 93 h con una sola dosis y ha mostrado un porcentaje de recuperación mayor que otras moléculas. Para diagnosticar y monitorear el tratamiento del paciente hemofílico se determina la actividad del FIX con el ensayo coagulable en una etapa (OSA: *one stage assay*) y/o en el ensayo cromogénico. El objetivo de este trabajo, realizado en tres centros, fue medir la recuperación de N9-GP con 10 reactivos de APTT diferentes en tres plataformas, en muestras deficientes en FIX adicionadas *in vitro* con N9-GP, en cuatro niveles de concentración diferentes. Los resultados muestran una heterogeneidad en la actividad de N9-GP medidos por OSA con los diferentes reactivos de APTT cuando se realizaron las calibraciones con el estándar específico de cada coagulómetro. Se obtuvo un porcentaje de recuperación mayor de 92% con Cephascreen, Actin FSL y APTTest elágico en las tres plataformas evaluadas. Estos reactivos serían los únicos apropiados cuando se usa el OSA calibrado con plasma comercial para monitorear el tratamiento de los pacientes que reciben N9-GP.

Palabras clave: Factor IX pegilado; Vida media extendida; Ensayo coagulable

High variability in the determination of Factor IX in plasma samples spiked with nonacog beta pegol between different reagents/detection system pairs

Abstract

Hemophilia B (HB) is an X-linked hereditary bleeding disorder characterised by coagulation factor IX (FIX) deficiency. To improve the quality of life of patients and adherence to treatment, recombinant factor concentrates

modified to extend their half-life have been developed. These are called extended half-life factors (EHL: extended half-life concentrates). Nonacog beta pegol (N9-GP) is a glycopegylated recombinant human FIX molecule that has a half-life of 93 h with a single dose and has shown a higher recovery percentage than other molecules. For diagnosis and monitoring the treatment of hemophilic patients, FIX activity is determined with the One Stage Clotting Assay (OSA) and/or the chromogenic assay. The objective of this work, carried out in three centres, was to measure the recovery of N9-GP with 10 different APTT reagents on three platforms, in FIX deficient samples spiked in vitro with N9-GP, at four different concentration levels. The results show a heterogeneity in the activity of N9-GP measured by OSA with the different APTT reagents when the calibrations were performed with the specific standard of each coagulometer. A recovery percentage greater than 92% was obtained with Cephascreen, Actin FSL and APTTest ellagic in the three platforms evaluated. These reagents would be the only ones appropriate when using the commercial plasma-calibrated OSA to monitor the treatment of patients treated with N9-GP.

Keywords: Pegylated factor IX; Extended half-life; Clottable assay

Alta variabilidade na determinação do Fator IX em amostras de plasma enriquecidas com nonacog beta pegol entre diferentes pares de reagentes/sistema de detecção

Resumo

A hemofilia B é uma doença hemorrágica hereditária ligada ao cromossomo X caracterizada pela deficiência do fator de coagulação IX (FIX). Para melhorar a qualidade de vida dos pacientes e a adesão ao tratamento, foram desenvolvidos concentrados de fatores recombinantes modificados para prolongar sua meia-vida, chamados de fatores de meia-vida estendida (EHL: extended half life concentrates). Nonacog beta pegol (N9-GP) é uma molécula de FIX humano recombinante glicopegulada que tem meia-vida de 93 h com uma dose única e mostrou uma porcentagem de recuperação maior do que outras moléculas. Para diagnosticar e monitorar o tratamento de pacientes hemofílicos, a atividade do FIX é determinada com o ensaio coagulável em um estágio (OSA: One Stage Assay) e/ou o ensaio cromogênico. O objetivo deste trabalho, realizado em três centros, foi medir a recuperação de N9-GP com 10 reagentes de APTT diferentes em três plataformas, em amostras deficientes de fator IX adicionadas in vitro com N9-GP, em quatro níveis de concentração diferentes. Os resultados mostram uma heterogeneidade na atividade de N9-GP medidos por OSA com os diferentes reagentes de APTT quando as calibrações foram realizadas com o padrão específico de cada coagulômetro. Uma porcentagem de recuperação superior a 92% foi obtida com Cephascreen, Actin FSL e APTTest elágico nas três plataformas avaliadas. Esses reagentes seriam os únicos apropriados ao usar o OSA calibrado com plasma comercial para monitorar o tratamento de pacientes tratados com N9-GP.

Palavras-chave: Fator IX pegulado; Meia-vida estendida; Ensaio coagulável

Introducción

La hemofilia B (HB) es un trastorno hemorrágico hereditario, ligado al cromosoma X, caracterizado por el déficit del factor IX de la coagulación. El tratamiento habitual de la hemofilia B consiste en reemplazar al factor IX faltante por concentrados comerciales de FIX recombinante (rFIX) o de derivados plasmáticos (dpFIX), ya sea a demanda para el tratamiento del sangrado agudo o con un régimen de profilaxis para prevenirlo. Los concentrados estándar de FIX tienen una vida media de 18 a 24 h y el tratamiento profiláctico con estos productos consiste en la administración del concentrado de factor dos veces por semana para mantener un nivel de FIX en plasma por encima del 1 o el

5%, según el objetivo terapéutico (1). En los últimos años se han desarrollado concentrados de factores recombinantes modificados para extender su vida media, denominados factores de vida media extendida (EHL: *extended half life concentrates*). Con el objetivo de prolongar la vida media del factor se han utilizado diferentes estrategias: a) rFIX fusionado con albúmina; b) rFIX fusionado con fragmento FC de IgG1 y c) pegilar con polietilenglicol (PEG) el rFIX. Estos productos de vida media extendida mejoran la calidad de vida de los pacientes con HB al disminuir la frecuencia de la infusión del factor y, como consecuencia, mejoran la adherencia al tratamiento (2) (3) (4) (5).

El nonacog beta pegol (N9-GP) (Refixia/Rebinyim) es una molécula de FIX humano recombinante glico-

pegilada que tiene una vida media en plasma de 93 h cuando se aplica una sola dosis. Diferentes estudios clínicos han demostrado eficacia y tolerancia del N9-GP tanto en población adulta como pediátrica y adolescente (6) (7) (8).

Para diagnosticar y monitorear el tratamiento del paciente hemofílico se determina la actividad del FIX con el ensayo coagulable en una etapa (OSA: *one stage assay*) y/o el ensayo cromogénico, que aún no está disponible en la Argentina (9). Existen diversos trabajos que muestran una gran variabilidad en la actividad de los distintos productos de vida media extendida determinada por OSA. Algunos de ellos señalan que la discrepancia estaría dada fundamentalmente por los tipos de reactivos del tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT) utilizados en el ensayo. La discrepancia es tal que el Subcomité de FVIII/FIX de la Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis ha recomendado que cada fabricante de concentrado de rFIX de vida media extendida defina cuál es el método y/o reactivo de APTT apropiado para determinar correctamente la actividad de su molécula con el fin de establecer el porcentaje de recuperación en los pacientes tratados (10).

Existen publicaciones en las que la actividad del N9-GP adicionado *in vitro* a un plasma deficiente en FIX sería sobreestimada con la mayoría de los reactivos que utilizan sílica como activador, a excepción de algunos reactivos que tienen menor concentración de sílica que los mencionados previamente, donde la actividad sería subestimada. No obstante, el nivel se podría determinar utilizando un reactivo polifenólico (STA Cephascreeen) o un reactivo con ácido elálgico en concentraciones medias y altas (SynthAFax; DG Synth) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17).

Rosén *et al.* demostraron que la sobreestimación del N9-GP con los reactivos de APTT que utilizan sílica en su composición, podría deberse a que el PEG media la co-localización del N9-GP con sus activadores FXIa y precalicreínas sobre la superficie de las partículas de sílice, acelerando así la conversión de N9-GP en FIXa durante la fase de activación del ensayo, antes del agregado del calcio (18).

Por otro lado, Persson sugirió que aquellos reactivos que subestiman la actividad de N9-GP generan una menor activación de éste en relación a la que se producen con el FIX contenido en el estándar de origen plasmático, dado que afectan negativamente la actividad del FXIa como consecuencia de su absorción (19).

El objetivo de este trabajo, realizado en tres centros, fue medir la recuperación de N9-GP con diez reactivos de APTT diferentes en tres plataformas distintas (dos con detección foto-óptica del coágulo y una por viscosidad), en muestras deficientes en FIX adicionadas *in vitro* con N9-GP en cuatro niveles de concentración diferentes.

Materiales y Métodos

Preparación de las muestras adicionadas *in vitro*

Las muestras se prepararon adicionando *in vitro* FIX recombinante, N9-GP (*Novo Nordisk Mállov*, Dinamarca) a un plasma inmunodeficiente en FIX comercial (*HemosIL FIX deficient plasma, Instrumentation Laboratory, Werfen Company*), para obtener muestras de 0,05; 0,13; 0,25; 0,50 y 1,00 UI/mL. Las muestras fueron preparadas en un único centro, alícuotadas a -80 °C, para luego ser transportadas y procesadas en los tres centros tras su descongelación por 5 min en baño a 37 °C.

Preparación del estándar de 1 UI/mL de N9-GP

A partir de la ampolla del producto se realizaron diluciones en solución fisiológica hasta obtener una solución de 1 UI/mL de N9-GP la cual se utilizó para reconstituir un plasma deficitario de FIX liofilizado (*HemosIL FIX deficient plasma, Instrumentation Laboratory, Werfen Company*) y así se obtuvo una solución de 1 UI/mL de N9-GP de matriz plasmática.

Determinación de FIX por el ensayo coagulable en una etapa

Se realizó en tres plataformas: 1) Sysmex CS 2500, *Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH*, Alemania, 2) ACL TOP 500, *Instrumentation Laboratory, Werfen Company*, EE.UU. y 3) STA Compact Max, *Diagnostica Stago*, Francia.

Se utilizó el método coagulable en una etapa con diversos reactivos de APTT (Tabla I).

Tabla I. Reactivos de APTT utilizados para el ensayo coagulable en una etapa.

Se indica el activador que utiliza cada reactivo

<i>Diagnostica Stago</i> , Francia	Cephascreeen: polifenol
	STA-C.K. Prest: caolín
	Trinicot aPTTS: sílica
Wiener Laboratorios, Argentina	APTTtest: ácido elálgico
<i>Siemens, Healthcare Diagnostics Products</i> , Alemania	Pathromtin SL: dióxido de sílice
	Actin: ácido elálgico
	Actin FSL: ácido elálgico
<i>Instrumentation Laboratory Werfen Company</i> , EE.UU.	APTT SP: sílica coloidal
	Synthasil: sílica coloidal en baja concentración
	SynthAFax: ácido elálgico

Por cada reactivo de APTT se realizaron dos curvas de calibración: una con plasma calibrador comercial específico del coagulómetro (*HemosIL Calibration plasma-Instrumentation Laboratory; Werfen Company*,

Unicalibrator-Diagnostica Stago; Stago, *Standard Human Plasma-Siemens Healthcare Diagnostics Products*) que están calibrados contra el estándar internacional de la OMS y con un calibrador de 1 UI/mL preparado en el laboratorio, como se menciona anteriormente. Se empleó el protocolo de calibración propio de cada coagulómetro para la determinación de factor IX en cuanto a números de puntos de la curva y replicados. El plasma deficitario inmunodepletado en FIX utilizado en cada caso fue específico de cada coagulómetro (*HemosIL FIX deficient plasma, Instrumentation Laboratory, Werfen Company* para el ACL TOP; *Immunodeficient FIX Diagnostica Stago, Stago*, para el STA Compact y *Coagulation Factor IX Deficient Plasma-Siemens Healthcare Diagnostics Products* para el Sysmex 2500).

Las curvas de calibración se validaron en cada caso utilizando controles de calidad internos de dos niveles (normal y patológico) específicos del equipo (*System control PN+PP, Diagnostica Stago, Francia, HemosIL Normal Control Assayed y HemosIL Special Test Level 2, Instrumentation Laboratory, Werfen Company y Control Plasma Ny Control Plasma P*, respectivamente).

Estadística: Se calculó el porcentaje de recuperación de cada dilución como: (FIX medido/FIX teórico) x 100. Se promedió el porcentaje de recuperación para cada reactivo en cada plataforma. Criterio de aceptabilidad: 100±20%.

Resultados

La Tabla II y la Figura 1 muestran el porcentaje de recuperación promedio obtenido en cada plataforma con cada reactivo cuando se utilizó plasma calibrador comercial específico de cada plataforma para realizar la curva. Tomando como criterio de aceptación una recuperación de 100±20% se puede observar que los reactivos que contienen sílica como activador en distintos estados sobreestimaron fuertemente los niveles de N9-GP a excepción de APTT SynthasIL que los subestimó. Según estos resultados, cuando se utiliza una curva de calibración con plasmas calibradores comerciales, los reactivos que sirven para monitorear el tratamiento con N9-GP en las plataformas evaluadas son: Cephascreen, que contiene polifenol como activador y APTTest y Actin FSL que contienen ácido elálgico. El porcentaje de recuperación promedio fue para Cephascreen/STA Compact: 93%; Cephascreen/CS-2500: 92% y Cephascreen/ACL TOP: 93%; APTTest /STA Compact: 100%; APTT/CS-2500: 87%; Actin FSL/STA Compact: 99%; Actin FSL/CS 2500: 99% y Actin FSL/ACL TOP: 104%.

Por otro lado, para otros reactivos que contienen ácido elálgico como activador como SynthAFax y Actin en las tres plataformas, se ha observado una sobreestimación de 150-239% y 127-214% respectivamente.

Este comportamiento se da en todo el rango de concentraciones estudiadas (0,05-1,0 UI/mL) y parece ser independiente del sistema de detección del coágulo utilizado, ya que para cada uno de los reactivos de APTT investigados no se observaron diferencias de comportamiento entre las distintas plataformas.

Cuando la curva de calibración se realiza con un calibrador preparado en el laboratorio a partir de la ampolla de N9-GP, todos los reactivos estudiados en todas las plataformas utilizadas cumplieron con el criterio de aceptabilidad para el porcentaje de recuperación promedio (Tabla III).

Discusión y Conclusiones

La determinación de la actividad de los factores de coagulación por OSA es un ensayo que tiene una gran variabilidad, debido principalmente a las diferentes preparaciones en cuanto a activador, concentración y tipo de fosfolípidos que componen los reactivos de APTT, tipo de plasma deficitario y a los distintos calibradores utilizados en los diferentes ensayos. Esta variabilidad resultó incrementada por las diferentes respuestas de los reactivos utilizados en el ensayo coagulable en una etapa a los factores recombinantes modificados de vida media extendida (3) (9). Diversos autores han demostrado que hay reactivos de APTT que sobreestiman las mediciones, otros las subestiman y no deberían ser utilizados para determinar la actividad de FIX en pacientes tratados con N9-GP (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (18) (19) (20) (21). La fortaleza de este estudio reside en que se han probado nueve reactivos de APTT, habitualmente disponibles en la Argentina, en tres plataformas distintas.

Los resultados muestran que en las tres plataformas utilizadas (dos con detección óptica y una por viscosidad) se observó una gran heterogeneidad en los resultados de actividad de N9-GP medidos por OSA con los diferentes reactivos de APTT, cuando se realizaron las calibraciones con el estándar comercial específico de cada coagulómetro (método habitual en los laboratorios clínicos).

De acuerdo con los resultados obtenidos del porcentaje de recuperación con los diferentes reactivos en las plataformas evaluadas, para monitorear el tratamiento de N9-GP podrían utilizarse Cephascreen que contiene polifenol como activador, Actin FSL y APT-Test que contienen ácido elálgico como activador. Este último reactivo es muy utilizado en la Argentina y no había sido evaluado en otros trabajos internacionales. Estos hallazgos coinciden con lo publicado por otros autores para Cephascreen (16) (18) (19). Los otros reactivos que contienen ácido elálgico como activador, SynthAFax y Actin, sobrestimaron la actividad de FIX. La diferencia de comportamiento entre los tres

Tabla II. Porcentaje de recuperación promedio de todas las diluciones para la determinación de N9-GP por el método coagulable en una etapa con distintos reactivos de APTT y plasma calibrador comercial. Criterio de aceptabilidad: ±20%. El reactivo de APTT C.K. Prest no es apto para coagulómetros ópticos. ND: no determinado.

Coagulómetro	Reactivo	Promedio % de recuperación
STA Compact	Cephascreen	✓ 108
	C.K. Prest	178
	Triniclot aPTT S	1636
	APTTtest	✓ 100
	Pathromtin	785
	Actin	167
	Actin FSL	✓ 99
	APTT-SP	876
	SynthasiL	75
	SynthAFax	150
Sysmex 2500	Cephascreen	✓ 92
	C.K. Prest	ND
	Triniclot aPTT S	1627
	APTTtest	87
	Pathromtin	896
	Actin	127
	Actin FSL	99
	APTT-SP	1006
	SynthasiL	68
	SynthAFax	162
ACL TOP 500	Cephascreen	✓ 93
	C.K. Prest	ND
	Triniclot aPTT S	1336
	APTTtest	ND
	Pathromtin	2082
	Actin	214
	Actin FSL	✓ 104
	APTT-SP	1173
	SynthasiL	58
	SynthAFax	-239

Sobreestima

Aceptable

Subestima

Fuerte sobreestimación

reactivos que contienen ácido elálgico como activador podría deberse a que cada uno de ellos contiene fosfolípidos de distintas fuentes: SynthAFax contiene fosfolípidos sintéticos, Actin contiene cefalina de cerebro de conejo y Actin FSL, una mezcla de fosfátidos de soja y fosfátidos de cerebro de conejo. Actin y Actin FSL contienen una concentración de ácido elálgico de 10⁻⁴ pero los fabricantes no declaran la concentración de ácido elálgico en SynthAFax.

En este estudio, cuando se utilizó SynthAFax hubo una sobreestimación en los resultados obtenidos, lo cual difiere con lo informado por otros autores. En nuestro estudio el porcentaje de recuperación obtenido fue mayor que el aceptable, con lo cual SynthAFax sobreestimó el nivel de N9-GP en todas las plataformas y a todas las concentraciones estudiadas. Si bien numerosas revisiones mencionaron a este reactivo como aceptable para medir N9-GP, todas se basan en un úni-

Tabla III. Porcentaje de recuperación promedio de todas las diluciones para la determinación de N9-GP por OSA con distintos reactivos de APTT calibrado con un estándar realizado en el laboratorio (ver Materiales y Métodos). Criterio de aceptabilidad: $100\pm 20\%$. El reactivo de APTT C.K. Prest no es apto para coagulómetros ópticos. ND: no determinado.

Coagulómetro	Reactivo	Promedio % de recuperación
STA Compact	Cephascreen	✓ 103
	C.K. Prest	✓ ND
	Triniclot aPTT S	✓ 87
	APTTtest	✓ 116
	Pathromtin	✓ 89
	Actin	✓ 113
	Actin FSL	✓ 103
	APTT-SP	✓ 85
	SynthasiL	✓ 113
	SynthAFax	✓ 105
Sysmex 2500	Cephascreen	✓ 96
	C.K. Prest	✓ ND
	Triniclot aPTT S	✓ 80
	APTTtest	✓ 85
	Pathromtin	✓ 81
	Actin	✓ 104
	Actin FSL	✓ 86
	APTT-SP	✓ 83
	SynthasiL	✓ 80
	SynthAFax	✓ 118
ACL TOP 500	Cephascreen	✓ 83
	C.K. Prest	✓ ND
	Triniclot aPTT S	✓ 80
	APTTtest	✓ ND
	Pathromtin	✓ 81
	Actin	✓ 104
	Actin FSL	✓ 86
	APTT-SP	✓ 83
	SynthasiL	✓ 80
	SynthAFax	✓ 118

co trabajo de Bowyer donde los mismos autores mencionan que ese resultado era esperable porque habían recibido las muestras adicionadas *in vitro* ya preparadas por el fabricante, cuya potencia había sido determinada con reactivo SynthAFax utilizando un calibrador de producto y con una técnica modificada del ensayo de OSA habitual. Sin embargo, existen otros trabajos que mostraron que SynthAFax sobreestimaba a bajas y muy bajas concentraciones de la droga (11) (12) (13). Tiefenbacher *et al.* mencionaron que el ensayo de actividad de FIX con este reactivo no era lineal a altas concentraciones cuando se utilizaba un *pool* normal como calibrador; en cambio, cuando se diluyó el calibrador con

plasma deficitario en lugar de con *buffer*, se lograba que los niveles de FIX en las muestras de pacientes posinfusión de N9-GP fueran similares, medidas tanto por SynthAFax/calibrador de N9-GP como por SynthAFax/*pool* normal como calibrador (20). Nederlof *et al.* en un trabajo sobre la medición de N9-GP en el contexto de un programa de evaluación externa de la calidad en el que se enviaron dos muestras de 6,0 UI/mL y 60 UI/mL preparadas *in vitro*, observaron que existía una gran variación en los resultados de actividad según los reactivos de APTT utilizados y, en particular con SynthAFax, detectaron una sobreestimación tanto para la muestra de 6 UI/mL como para la de 60 UI/mL (21).

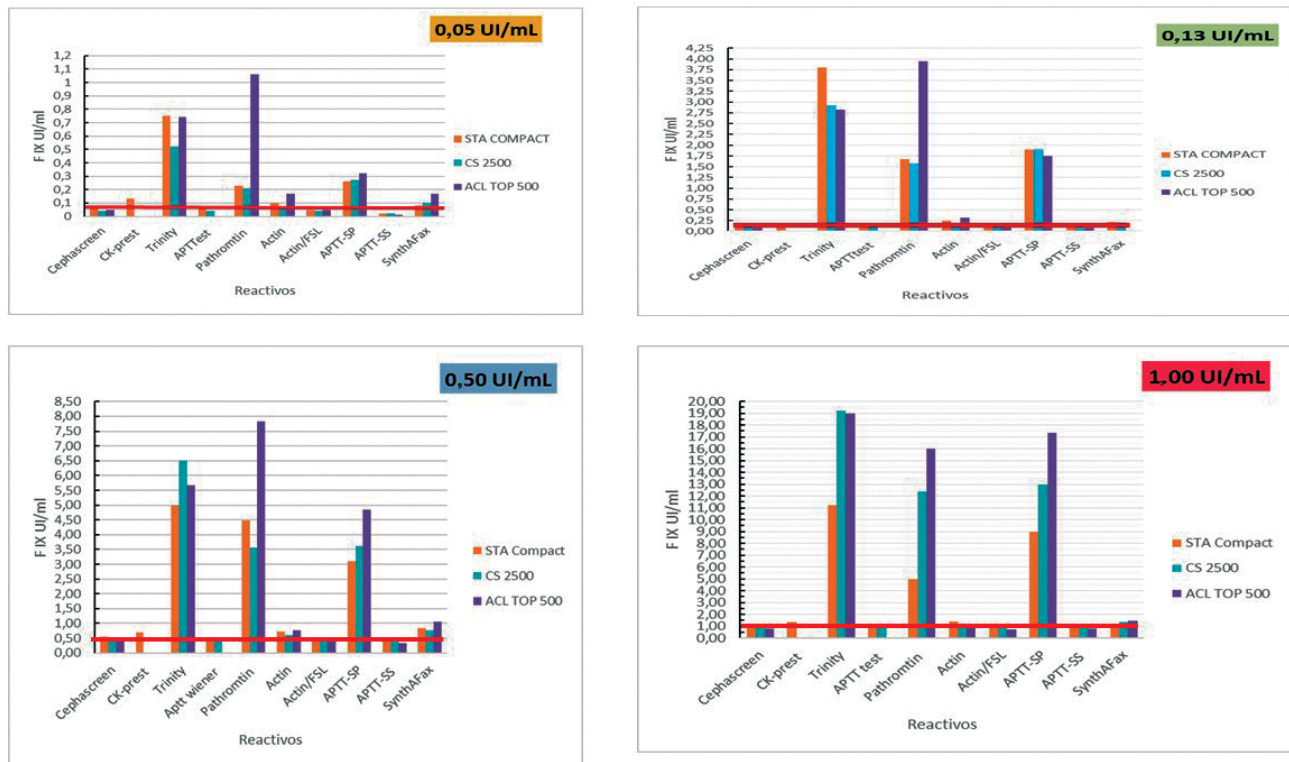


Figura 1. Porcentaje de recuperación para cada una de las concentraciones estudiadas. La línea roja marca el valor teórico.

Por otro lado, los tres reactivos que contenían sílica como activador sobreestimaron los valores de recuperación, a excepción de APTT SynthasIL que los subestimó recuperando sólo entre un 50 y un 70% de acuerdo con lo observado por otros autores (11) (12) (13) (14) (15) (16).

En este estudio los porcentajes de recuperación obtenidos, cuando se utilizó un calibrador preparado *in house* a partir de la ampolla de N9-GP, fueron cercanos al 100% con todos los reactivos estudiados en las tres plataformas, en coincidencia con otros autores (2) (3) (9).

La utilización de ensayos con calibradores específicos de N9-GP podría ser de utilidad para una mejor recuperación, independiente del reactivo de APTT; sin embargo, las guías internacionales no lo recomiendan porque a veces es difícil que el laboratorio acceda al producto y por falta de estandarización (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22).

En la práctica clínica cada plataforma realiza los OSA con reactivos de APTT, calibradores y plasmas deficientes inmunodepletados del mismo fabricante. En este trabajo se ha probado cada reactivo de APTT en tres coagulómetros con calibradores y plasmas deficientes, específicos del coagulómetro y no del fabricante del reactivo de APTT; no obstante ello, el comportamiento

de recuperación esperable, sobre o subestimación, se evidenció de manera similar.

Es muy difícil comparar los resultados de los distintos estudios ya que algunos utilizaron diversos reactivos en diferentes coagulómetros con distintos calibradores y diferentes plasmas deficientes; sin embargo, todos los trabajos coinciden en señalar que las modificaciones sobre el FIX nativo para prolongar su vida media tienen algún efecto sobre el ensayo coagulable en una etapa. Este efecto es variable y poco predecible con los diferentes reactivos de APTT (2) (3) (9) (13).

Una de las limitaciones de este estudio es haber utilizado muestras adicionadas *in vitro* en lugar de las muestras de pacientes tratados con N9-GP. No obstante, Sørensen *et al.* han demostrado que los plasmas deficientes de FIX adicionados *in vitro* con N9-GP y los plasmas de pacientes tratados con N9-GP mostraban *ex vivo* un comportamiento similar en los ensayos coagulables en una etapa y en los ensayos cromogénicos para determinar la actividad de N9-GP (14).

En conclusión, los resultados de este estudio muestran, en concordancia con lo publicado por otros autores, que hay una gran variabilidad en la medición de la actividad de N9-GP en muestras adicionadas *in vitro* con este producto de vida media extendida. Algunos reactivos lo miden correctamente, otros sobreestiman

o subestiman sin un patrón predecible. En general y con algunas excepciones, los reactivos que contienen sílice como activador sobreestiman fuertemente el valor de N9-GP. La recomendación internacional es utilizar métodos cromogénicos que no están disponibles aún en la Argentina o el ensayo coagulable en una etapa con determinados reactivos de APTT que contienen ácido eláxico o polifenol como activador. Cada laboratorio debería verificar si el OSA que utiliza en la práctica clínica tiene un buen desempeño para medir N9-GP.

Agradecimientos

Los autores agradecen a NovoNordisk SA por la donación de la ampolla de Refixia, a *Instrumentation Laboratory* por la donación del reactivo Synthafax y a laboratorios Wiener por la donación del reactivo APTTtest para la realización de este estudio.

Fuentes de financiación

Para este trabajo no se recibió ninguna financiación específica más allá de las donaciones de reactivos mencionadas en los agradecimientos.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

Correspondencia

Dra. CRISTINA DUBOSCQ
Correo electrónico: cduboscq58@hotmail.com

Referencias bibliográficas

1. Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW, *et al.* WFH Guidelines for the management of hemophilia panelists and co-authors. WFH Guidelines for the management of hemophilia, 3rd ed. *Haemophilia* 2020 Aug; 26 (Suppl 6): 1-158. *Erratum in: Haemophilia* 2021 Jul; 27 (4): 699.
2. Ovanesov MV, Williams SC, Nübling CM, Dodt J, Hilger A, Maryuningsih Y, *et al.* Summary of the WHO hearing on the development of product-specific reference materials for coagulation factor VIII and factor IX products. *Biologicals* 2020 Sep; 67: 88-93.
3. Kitchen S, Kershaw G, Tiefenbacher S. Recombinant to modified factor VIII and factor IX-chromogenic and one-stage assays issues. *Haemophilia* 2016 Jul; 22 (Suppl 5): 72-7.
4. Marchesini E, Morfini M, Valentino L. Recent advances in the treatment of hemophilia: a review. *Biologicals* 2021 Jun 15; 15: 221-35.
5. Mannucci PM. Hemophilia therapy: the future has begun. *Haematologica* 2020 Mar; 105 (3): 545-53.
6. Østergaard H, Bjelke JR, Hansen L, Petersen LC, Pedersen AA, Elm T, *et al.* Prolonged half-life and preserved enzymatic properties of factor IX selectively PEGylated on native N-glycans in the activation peptide. *Blood* 2011 Aug 25; 118 (8): 2333-41.
7. Negrier C, Knobe K, Tiede A, Giangrande P, Møss J. Enhanced pharmacokinetic properties of a glycoPEGylated recombinant factor IX: a first human dose trial in patients with hemophilia B. *Blood* 2011 Sep 8; 118 (10): 2695-701.
8. Collins PW, Young G, Knobe K, Karim FA, Angchaisuk-siri P, Banner C, *et al.* Recombinant long-acting glyco-PEGylated factor IX in hemophilia B: a multinational randomized phase 3 trial. *Blood* 2014 Dec 18; 124 (26): 3880-6.
9. Peyvandi F, Kenet G, Pekrul I, Pruthi RK, Ramge P, Spannagl M. Laboratory testing in hemophilia: impact of factor and non-factor replacement therapy on coagulation assays. *J Thromb Haemost* 2020 Jun; 18 (6): 1242-55.
10. Hubbard AR, Dodt J, Lee T, Mertens K, Seitz R, Srivastava A, *et al.* Factor VIII and Factor IX concentrates. *J Thromb Haemost* 2013 May; 11 (5): 988-9.
11. Bowyer AE, Hillarp A, Ezban M, Persson P, Kitchen S. Measuring factor IX activity of nonacog beta pegol with commercially available one-stage clotting and chromogenic assay kits: a two-center study. *J Thromb Haemost* 2016 Jul; 14 (7): 1428-35.
12. Augustsson C, Norström E, Andersson NG, Zetterberg E, Astermark J, Strandberg K. Monitoring standard and extended half-life products in hemophilia: assay discrepancies for factor VIII and IX in pre- and postinfusion samples. *Res Pract Thromb Haemost* 2020 Aug 11; 4 (7): 1114-20.
13. Ezban M, Hermit MB, Persson E. FIXing postinfusion monitoring: assay experiences with N9-GP (nonacog beta pegol; Refixia[®]; Rebinyn[®]). *Haemophilia* 2019 Jan; 25 (1): 154-61.
14. Sørensen MH, Andersen S, Ezban M. Factor IX-deficient plasma spiked with N9-GP behaves similarly to N9-GP post-administration clinical samples in N9-GP ELISA and FIX activity assays. *Haemophilia* 2015 Nov; 21 (6): 832-6.
15. Adcock DM, Strandberg K, Shima M, Marlar RA. Advantages, disadvantages and optimization of one-stage and chromogenic factor activity assays in hemophilia A and B. *Int J Lab Hematol* 2018 Dec; 40 (6): 621-9.
16. Tiefenbacher S, Bohra R, Amiral J, Bowyer A, Kitchen S, Lochu A, *et al.* Qualification of a select one-stage activated partial thromboplastin time-based clotting assay and two chromogenic assays for the post-administration monitoring of nonacog beta pegol. *J Thromb Haemost* 2017 Oct; 15 (10): 1901-12.
17. Arias M, Sueldo E. Monitoreo de productos de vida media extendida en pacientes con hemofilia B. *Rev Hematol* 2021; 25 (2): 90-4.

18. Rosén P, Rosén S, Ezban M, Persson E. Overestimation of N-glycoPEGylated factor IX activity in a one-stage factor IX clotting assay owing to silica-mediated premature conversion to activated factor IX. *J Thromb Haemost* 2016 Jul; 14 (7): 1420-7.
19. Persson E, La Cour Christoffersen C. Underestimation of N-glycoPEGylated factor IX one-stage clotting activity owing to contact activator-impaired activation. *Res Pract Thromb Haemost* 2017 Sep 25; 1 (2): 259-63.
20. Tiefenbacher S, Robinson M, Sorensen MH. Validation of the factor IX one-stage APTT clot assay calibrated with pooled normal plasma for the measurement of N9-GP in patients plasma. *Res Pract Thromb Haemost* 2017; 1 (Suppl 1): 843-4 (Abstract PB 1990).
21. Nederlof A, Kitchen S, Meijer P, Cnossen M, Ali Pour N, Kershaw G, *et al.* Performance of factor IX extended half-life product measurements in external quality control assessment programs. *J Thromb Haemost* 2020 Aug; 18 (8): 1874-83.
22. Gray E, Kitchen S, Bowyer A, Chowdary P, Jenkins PV, Murphy P, *et al.* Laboratory measurement of factor replacement therapies in the treatment of congenital haemophilia: a United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation guideline. *Haemophilia* 2020 Jan; 26 (1): 6-16.

Recibido: 19 de noviembre de 2022

Aceptado: 22 de junio de 2023