

LupoTek KCT

For the detection of circulating lupus-like anticoagulants

interferant class	Added interferant	Maximum concentration tested	Maximum tolerated concentration
Hemolysis	Hemoglobin	500 mg/dL	500 mg/dL
Icterus	Unconjugated bilirubin	20 mg/dL	20 mg/dL
Lipemia	IntraLipid®	2,000 mg triglyceride/dL	2,000 mg/dL
Heparin	Heparin	2.0 Unit/mL	<0.1 Unit/mL

Intralipid® is a registered trademark of Fresenius Kabi.

Normal Reference Range: One hundred thirty-one normal donors were analyzed on the STA Compact. The geometric mean and standard deviation of the clotting times were calculated, and the range was calculated as the mean +/- 2 standard deviations. The calculated normal range was 49.2 - 90.7 seconds.

These values should be considered illustrative only. Each laboratory should establish its own normal reference range on its own instrument(s).
Method Comparison: A total of one hundred eighty patient samples of known clinical status, including known LA patients, were analyzed in three laboratories with a test lot of KCT and with Phospholin ES, an LA sensitive APTT reagent. Each sample was scored as abnormal for either the KCT or the APTT according to their raw clotting times. Percent positive, percent negative, and overall percent agreement with the clinical status were calculated according the FDA guidance document 1620,

“Statistical Guidance on Reporting Results from Studies Evaluating Diagnostic Tests”. The results were:

Three site study	LupoTek KCT	APTT
Percent Positive Agreement (for LA)	100%	87%
Percent Negative Agreement (for LA)	59%	15%
Overall Percent Agreement	79%	50%

The performance of any assay is influenced by the instrumentation on which it is run and the practices of the laboratory. Each assay should be reviewed for the individual analyzer(s) in use in each laboratory according to the CLSI guideline EP15-A2 “User Verification of Performance for Precision and Trueness” (12) or to a similar guideline.

REFERENCES

- Margolis J. The kaolin clotting time. A rapid one-stage method for diagnosis of coagulation defects. J.Clin.Pathol. 11:406-409, 1958.
- Exner T, Rickard KA, Kronenberg H. A sensitive test demonstrating lupus anticoagulant and its behavioural patterns. Br.J.Haematol. 40:143-151, 1978.
- Lesperance B., et al. Relative sensitivity of different tests in the detection of low titre lupus anticoagulants. Thromb. Haemostasis. 60: 217-219, 1988.
- Brandt JT, et al. Criteria for the diagnosis of Lupus Anticoagulants: An update. Thromb. Haemost. 74: 1185-1190, 1995.
- Rosner R, Pauzner R, Luskay A. Detection and quantitative evaluation of lupus anticoagulant activity. Thromb.Haemostas. 57:144-147, 1987.
- Gibson J, Starling E, Date L,et al. Simplified screening procedure for detecting lupus inhibitors. J.Clin. Pathol. 41:225-231, 1988.
- H21-A5, “Collection, Transport, and Processing of Blood Samples for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition”, Clinical Laboratory Standards Institute, 2008.
- Exner T. Comparison of Two Simple Tests for Lupus Anticoagulant. Am. J. Clin. Path. 83: 215, 1985.
- Marques MB and Fritsma GA. Quick Guide to Coagulation Testing. AACC Press, 2006.
- McGlasson DL, Brey RL, Strickland DM, Patterson WR. Differences in kaolin clotting times and platelet counts resulting from variations in specimen processing. Clin.Lab.Sci. 2:109-110, 1989.
- EP5-A2, “Evaluation of Precision Performance of

- Quantitative Measurement Methods: Approved Guideline-Second Edition”, Clinical Laboratory Standards Institute, 2004
- 12) EP15-A2, “User Verification of Performance for Precision and Trueness: Approved Guideline-Second Edition”, Clinical Laboratory Standards Institute, 2005.

VERSION FRANCAISE UTILISATION PREVUE

Le réactif LupoTek KCT (temps de céphaline kaolin) est un réactif de céphaline activée sans phospholipides. Le LupoTek KCT est un dosage de dépistage *in vitro* qualitatif de la coagulation destiné aux laboratoires professionnels pour aider à détecter les anticoagulants circulants de type lupique dans le plasma humain citraté.

RÉSUMÉ

Le temps de céphaline kaolin (TCK), un test du temps de céphaline activée utilisant le kaolin comme activateur, a été décrit pour la première fois en 1958 (1). Le temps de céphaline kaolin formulé sans phospholipides ajoutés (TCK) a d’abord été utilisé pour étudier les anticoagulants lupiques (AL) en 1978 (2).

Le test TCK a été déclaré comme le test le plus sensible pour la détection d’anticoagulants circulants comme les AL (3), et c’est l’un des tests recommandés par l’ISTH dans le diagnostic des AL (4).

PRINCIPE

Le LupoTek KCT est un réactif de temps de céphaline activée sans phospholipides ajoutés utilisant le kaolin comme activateur de contact. En l’absence de phospholipides ajoutés, le dosage n’accélère que faiblement la cascade de la coagulation et est sensible aux maladies de la coagulation dans les voies de contact et les voies communes.

RÉACTIFS

Pour usage diagnostique *in vitro* uniquement

LupoTek KCT

Référence de catalogue 87-305 :

5 flacons de 5 ml de réactif TCK

5 flacons de 5 ml de réactif Chlorure de calcium 0,025 M

1. Réactif TCK

Ingrédients : chaque flacon de LupoTek KCT contient 5 ml de kaolin de faible turbidité, à dépôt lent, formulé avec une stabilité colloïdale améliorée, adaptée aux tests TCK automatisés. Le réactif ne contient pas de phospholipides.
Préparation à l’utilisation : LupoTek KCT est fourni sous forme de suspension liquide, susceptible de se déposer durant le stockage. S’assurer que le réactif est complètement remis en suspension et soigneusement mélangé avant et pendant l’utilisation.

2. Réactif Chlorure de calcium

Ingrédients : chaque flacon contient 5 ml de réactif Chlorure de calcium 0,025 M stabilisé avec de l’azoture de sodium à 0,02 %.

Préparation à l’utilisation : le réactif Chlorure de calcium est conditionné prêt à l’emploi.

Conservation et stabilité des deux réactifs : les flacons non ouverts sont stables jusqu’à la date de péremption imprimée sur les étiquettes en cas de conservation à 2-8 °C. La stabilité des flacons ouverts est de 24 heures à température ambiante.
AVERTISSEMENT : AZOTURE DE SODIUM. L’azoture de sodium peut former des azides métalliques hautement explosifs en cas d’exposition au plomb ou au cuivre présent dans les canalisations. Tout matériau de ce type doit être jeté dans un évier avec de grands volumes d’eau pour minimiser ce risque.

Matériel et équipement nécessaire mais non fourni :

Analyseur de coagulation semi-automatique ou automatique
Équipement et matériel courant de laboratoire clinique comme centrifugeuses, tubes à essai, pipettes et eau distillée.

Plasmas de contrôle :

PlasmaCon N

PlasmaCon LA

PRÉLÈVEMENT ET MANIPULATION DES ÉCHANTILLONS

Le plasma est obtenu à partir de sang total anti-coagulé avec 1 partie de citrate de sodium à 3,2 % pour 9 parties de sang total. Traiter le sang total prélevé, centrifuger à deux reprises le plasma, et manipuler le plasma conformément à la recommandation H21-A5 du CLSI (ou édition de remplacement) (7).

PROCÉDURE D’ESSAI

Veillez contacter r2 Diagnostics pour les applications validées.

TESTS DE MÉLANGE

Des tests de mélange sont recommandés avec le réactif LupoTek KCT afin de faire la distinction entre les déficiences en facteur et les inhibiteurs liés aux anticorps dans les tests

ENGLISH VERSION INTENDED USE

The LupoTek kaolin clotting time (KCT) is a kaolin activated partial thromboplastin reagent without phospholipid. The LupoTek KCT is a qualitative *in vitro* coagulation screening assay for use in professional laboratories as an aid in the detection of circulating lupus-like anticoagulants in citrated human plasma.

SUMMARY

The Kaolin Clotting Time (PTTK), an activated partial thromboplastin time test which uses kaolin as the activator, was first described in 1958 (1). The Kaolin Clotting Time formulated without any added phospholipid (KCT) was first used to study lupus anticoagulants (LA) in 1978 (2).

The KCT test has been reported to be the most sensitive test for the detection of circulating anticoagulants such as LA (3), and is one of the tests recommended by the ISTH for use in the diagnosis of LA (4).

PRINCIPLE

The LupoTek KCT is an activated partial thromboplastin time reagent without any added phospholipids and with kaolin as the contact activator. In the absence of added phospholipid the assay only poorly accelerates the clotting cascade and is sensitive to coagulopathies in the contact and common pathways.

REAGENTS

For In Vitro Diagnostic Use Only

LupoTek KCT

Catalog Number 87-305:

5 x 5 mL vials of KCT reagent

5 x 5 mL vials of 0.025M Calcium Chloride reagent

1. KCT Reagent

Ingredients: Each vial of LupoTek KCT contains 5 mL of a low turbidity, slow-settling kaolin formulated with enhanced colloidal stability, suitable for automated KCT tests. The reagent contains no phospholipid.

Preparation for Use: LupoTek KCT is provided as a liquid suspension, which can settle upon storage. Ensure the reagent is completely re-suspended and thoroughly mixed before and during use.

2. Calcium Chloride Reagent

Ingredients: Each vial contains 5 mL 0.025M Calcium Chloride reagent stabilized with 0.02% Sodium Azide.

Preparation for Use: The Calcium Chloride reagent is packaged ready for use.

Storage and stability of both reagents: Unopened vials are stable until the expiration date printed on the labels when stored at 2-8°C. Open-vials stability is 24 hours when stored at room temperature.

WARNING: SODIUM AZIDE. Sodium azide can form highly explosive metal azides if exposed to lead or copper in plumbing. Any such materials should be discarded into a sink only with large volumes of water to minimize such a risk.
Materials and Equipment Required but not Provided: Semi-automated or automated coagulation analyzer
Common clinical laboratory equipment and materials such as centrifuges, test tubes, pipettes, and distilled water.

Control Plasmas:

PlasmaCon N

PlasmaCon LA

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Plasma is obtained from whole blood anti-coagulated with 1 part 3.2% sodium citrate to 9 parts whole blood. Process the collected whole blood, double centrifuge the plasma, and handle the plasma according to the CLSI guideline H21-A5 (or superseding edition) (7).

ASSAY PROCEDURE

Please contact r2 Diagnostics for validated applications.

MIXING TESTS

Mixing tests are recommended for use with the LupoTek KCT reagent in order to distinguish between factor deficiencies and antibody related inhibitors in samples testing outside the normal range (2), r² recommends the 1:1 mix of patient plasma and normal pooled plasma for most testing purposes (6).

Normal plasma pools (NPP) used for the mixing studies should be a carefully prepared pool of normal donors. The donor plasma should be prepared in a similar fashion to the patient samples. All plasmas should be double spun or filtered to remove platelet fragments. The normal pool should be well

characterized to ensure at least 75% activity of all coagulation factors. The normal pool may be aliquoted and stored at < -50°C to provide some measure of standardization.

QUALITY CONTROL

Quality control of coagulation tests involves multiple components. Each laboratory should establish a quality control program that includes both normal and abnormal control plasmas.

EXPRESSION OF RESULTS

The KCT of neat patient sample and mixes of patient sample and NPP may be expressed as the raw clotting time in seconds.

INTERPRETATION OF RESULTS

An abnormal KCT time is only generally indicative of a defect in coagulability of the neat sample. Mixing tests with NPP are usually performed to distinguish between factor deficiencies and antibody inhibitors. 1:1 mixes that recover within the normal range of the KCT assay are often indicative of factor deficiencies, whereas those that remain abnormal are often indicative of antibody-related inhibitors.

Further workup with Factor assays, phospholipid-dependent Lupus Anticoagulant assays, or antibody affected assays such as the Bethesda assay are required to determine the final diagnosis (6, 9). No single assay is definitive for Lupus anticoagulants. The diagnosis of LA requires an algorithm that includes multiple assays (4).

LIMITATIONS:

Heparin interferes with the KCT. The KCT test is not suitable for patients undergoing heparin. Samples either known to contain heparin or suspected of heparin contamination should be further analyzed with either the Thrombin Time and Reptilase Time tests, or treated with heparinase, according to generally accepted laboratory protocols (9).

The KCT may be prolonged due to a variety of clinical conditions, such as factor deficiencies or oral anticoagulant therapy. Mixing studies are recommended to differentiate between these conditions and antibody-like inhibition (6, 9).

Platelet contamination can cause problems in kaolin-based APTT reagents and KCT reagents and can shorten the clot times, particularly with freeze-thawed plasma (10). Plasmas should be double centrifuged, especially prior to freezing.

The KCT has not been evaluated for patients undergoing Direct Thrombin Inhibitor therapy. The KCT has not been evaluated in pediatric populations.

The performance characteristics of the LupoTek KCT have been determined using an automated analyzer with a mechanical detection system (the Stago Compact). Please contact r² Diagnostics for validated instrument applications.

PERFORMANCE CHARATERISTICS

Precision: Precision estimates of three lots of LupoTek KCT were determined in a two run per day, twenty day exercise using normal and abnormal (LA positive) QC plasmas as described in the CLSI guideline EP5-A2 “Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods” (11) on a Stago STA Compact. The average precision results as %CV of the clotting times were:

Plasma	Mean Time (sec)	Repeatability	Total
Normal	61.8	1.2%	2.2%
Abnormal	266.3	3.1%	6.6%

Interferences: Interference studies of LupoTek KCT were determined on the Stago STA Compact. Interferant was spiked into pooled normal plasma and a dilution series prepared. The maximum concentration tolerated in the assay was defined as the highest concentration of interferant wherein any consistent shift relative to the recovered value of the base PNP clotting time was less than 10%. The maximum concentrations were:

LupoTek KCT, reattivo di coagulazione per uso diagnostico

VERSIONE ITALIANA
USO PREVISTO

Il reagente per il tempo di coagulazione al caolino (KCT) LupoTek è un reagente per il test della tromboplastina parziale attiva al caolino senza fosfolipidi. LupoTek KCT è un dosaggio qualitativo di screening di coagulazione in vitro per l’uso in laboratori professionali come aiuto nel rilevamento degli anticoagulanti lupici circolanti nel plasma umano citrato.
RIEPILOGO

Il test del tempo di coagulazione al caolino (PTTK), un test del tempo della tromboplastina parziale attivata che utilizza il caolino come attivatore, è stato descritto per la prima volta nel 1958 (1). Il test del tempo di coagulazione al caolino formulato senza l’aggiunta di fosfolipidi (KCT) è stato usato per la prima volta per studiare gli anticoagulanti lupici (LA) nel 1978 (2).

È emerso che il KCT è il test più sensibile per il rilevamento degli anticoagulanti circolanti, come LA (3), ed è uno dei test raccomandati dall’ISTH per l’uso nella diagnosi di LA (4).

PRINCIPIO

LupoTek KCT è un reagente per il tempo di tromboplastina parziale attivata senza l’aggiunta di fosfolipidi e con il caolino come attivatore della fase di contatto. In assenza di fosfolipidi aggiunti, il dosaggio accelera solo scarsamente la cascata coagulativa ed è sensibile alle coagulopatie nei percorsi di contatto e comuni.

REAGENTI

Solo per uso diagnostico *in-vitro*

LupoTek KCT

Numero di catalogo 87-305:

5 fiale da 5 ml di reagente KCT

5 fiale da 5 ml di reagente a base di cloruro di calcio 0,025 M

1. Reagente KCT

Ingredienti: Ogni fiala di LupoTek KCT contiene 5 ml di caolino a bassa torbidità, sedimentazione lenta formulato con maggiore stabilità colloidale, adatto ai test KCT automatici. Il reagente non contiene fosfolipidi.

Preparazione per l’uso: LupoTek KCT viene fornito sotto forma di sospensione liquida, che può sedimentarsi durante la conservazione. Verificare che il reagente sia completamente ri-sospeso e completamente miscelato prima e durante l’uso.

2. Reagente con cloruro di calcio

Ingredienti: Ogni fiala contiene 5 ml di reagente con cloruro di calcio 0,025 M stabilizzato con sodio azide allo 0,02%.

Preparazione per l’uso: Il reagente con cloruro di calcio viene confezionato pronto per l’uso.

Conservazione e stabilità di entrambi i reagenti: Le fiale chiuse sono stabili fino alla data di scadenza stampata sulle etichette se conservate a 2-8 °C. Le fiale aperte sono stabili per 24 ore se conservate a temperatura ambiente.

AVVERTENZA: SODIO AZIDE. La sodio azide può formare azidi metalliche altamente esplosive se esposta al contatto con le tubature in piombo o rame. Per ridurre al minimo tale rischio, questi materiali devono essere smaltiti esclusivamente in contenitori con grandi quantità di acqua.

Materiali e attrezzature richiesti ma non forniti:

Analizzatore di coagulazione semi-automatico o automatico Normale attrezzatura e materiale da laboratorio clinico, come centrifughe, provette, pipette e acqua distillata.

Plasma di controllo:

PlasmaCon N

PlasmaCon LA

RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

Il plasma si ottiene dal sangue intero anti-coagulato con 1 parte di citrato di sodio al 3,2% e 9 parti di sangue intero. Trattare il sangue intero raccolto, eseguire una doppia centrifugazione del plasma e trattare il plasma secondo le linee guida CLSI H21-A5 (o edizione sostitutiva) (7).

PROCEDURA DEL DOSAGGIO

Contattare r2 Diagnostics per le applicazioni convalidate.

TEST DI MISCELAZIONE

I test di miscelazione sono raccomandati per l’uso con il reagente LupoTek KCT al fine di distinguere tra carenze di fattore e inibitori correlati all’anticorpo nei campioni con test fuori dal normale intervallo (2). r² raccomanda la miscela 1:1 di plasma paziente e plasma in pool normale per la maggior parte dei test (6).

I pool di plasma normale (NPP) utilizzati per gli studi di

miscelazione devono essere pool attentamente preparati, ottenuti da donatori normali. Il plasma del donatore deve essere preparato in modo simile ai campioni del paziente. Tutti i plasma devono essere sottoposti a doppia rotazione o filtrazione per rimuovere i frammenti di piastrine. Il pool normale deve essere ben caratterizzato per assicurare almeno il 75% di attività di tutti i fattori di coagulazione. Il pool normale può essere aliquotato e conservato a < -50 °C per fornire una misura di standardizzazione.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Il controllo di qualità per i test di coagulazione comprende diversi componenti. Ogni laboratorio deve stabilire un programma di controllo qualità composto da plasma di controllo sia normali che anormali.

ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il KCT di campione di paziente puro e le miscele di campione paziente e NPP possono essere espressi come tempo di coagulazione grezzo in secondi.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Un tempo KCT anormale è solo generalmente indicativo di un difetto di coagulazione del campione puro. I test di miscelazione con NPP vengono generalmente eseguiti per distinguere tra le carenze di fattore e gli inibitori anticorpali. Le miscelezioni 1:1 che si ottengono nell’intervallo normale del dosaggio KCT sono spesso indicative di carenze di fattore, mentre quelle che rimangono anormali sono spesso indicative di inibitori anticorpali.

Ulteriori controlli con dosaggi con fattore, dosaggi con anticoagulanti lupici dipendenti dai fosfolipidi o dosaggi influenzati da anticorpi, come il dosaggio Bethesda, sono necessari per determinare la diagnosi finale (6, 9). Nessun dosaggio singolo è definitivo per gli anticoagulanti lupici. La diagnosi di LA richiede un algoritmo che include diversi dosaggi (4).

LIMITAZIONI:

L’eparina interferisce con il KCT. Il test KCT non è adatto per i pazienti che trattati con eparina. I campioni che contengono notoriamente eparina o di cui si sospetta contaminazione da eparina devono essere ulteriormente analizzati con i test del tempo di trombina e del tempo di reptilasi, oppure trattati con eparinasi, in base ai protocolli di laboratorio generalmente accettati (9).

Il KCT può essere prolungato a causa di una varietà di condizioni cliniche, come carenze di fattore o terapia anticoagulante orale. Gli studi di miscelazione sono raccomandati per distinguere tra queste condizioni e l’imibizione di tipo anticorpale (6, 9).

La contaminazione delle piastrine può causare problemi nei reagenti APTT al caolino e nei reagenti KCT e può accorciare i tempi di coagulazione, in particolare con il plasma congelato-scongelato (10). Il plasma deve essere centrifugato, specialmente prima del congelamento.

Il KCT non è stato valutato nei pazienti sottoposti a terapia con inibitori diretti della trombina. Il KCT non è stato valutato nelle popolazioni pediatriche.

Le caratteristiche prestazionali del LupoTek KCT sono state determinate usando un analizzatore automatico con un sistema di rilevamento meccanico (Stago Compact). Contattare r² Diagnostics per le applicazioni di strumenti convalidate.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Precisione: Le stime di precisione di tre lotti di LupoTek KCT sono state determinate in un’attività di venti giorni, con due fasi al giorno, usando plasma QC normale e anormale (positivo LA) come descritto nelle linee guida CLSI EP5-A2 “Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods” (11) (Valutazione delle prestazioni di precisione dei metodi di misurazione quantitativa) su Stago STA Compact. I risultati medi di precisione come %CV dei tempi di coagulazione sono stati:

Plasma	Tempo medio (sec)	Ripetibilità	Totale
Normale	61,8	1,2%	2,2%
Anormale	266,3	3,1%	6,6%

Interferenze: Gli studi sulle interferenze di LupoTek KCT sono stati determinati su Stago STA Compact. Nel pool di plasma normale è stato inserito un interfernete ed è stata preparata una serie di diluizioni. La concentrazione massima tollerata nel dosaggio è stata definita come la massima

concentrazione di interferente in cui qualunque scostamento uniforme relativo al valore recuperato del tempo di coagulazione PNP base era inferiore al 10%. Le concentrazioni massime sono state:

Classe interferen te	Interferent e aggiunto	Massima concentrazio ne testata	Massima concentrazio ne tollerata
Emolisi	Emoglobi na	500 mg/dL	500 mg/dL
Iittero	Bilirubina non coniugata	20 mg/dL	20 mg/dL
Lipemia	IntraLipid ®	2.000 mg trigliceridi/d L	2.000 mg/dL
Eparina	Eparina	2,0 Unità/ml	<0,1 Unità/ml

Intralipid® è un marchio registrato di Fresenius Kabi.
Intervallo di riferimento normale: Centotrentuno donatori normali sono stati analizzati con STA Compact. È stata calcolata la deviazione geometrica media e standard dei tempi di coagulazione e l’intervallo è stato calcolato come la deviazione standard +/- 2. L’intervallo normale calcolato era di 49,2 - 90,7 secondi.

Questi valori devono essere considerati puramente indicativi. Ogni laboratorio deve stabilire il proprio intervallo di riferimento normale in base ai propri strumenti.

Confronto tra i metodi: Centottanta campioni di pazienti con stato clinico noto, inclusi i pazienti con LA nota, sono stati analizzati in tre laboratori con un lotto di test di KCT e con Phospholin ES, un reagente APTT sensibile a LA. Ogni campione è stato valutato anormale da KCT o APTT in base ai rispettivi tempi di coagulazione grezzi. La percentuale di accordo positiva, negativa e complessiva rispetto allo stato clinico è stata calcolata in base alle linee guida FDA contenute nel documento 1620 “Statistical Guidance on Reporting Results from Studies Evaluating Diagnostic Tests” (Guida statistica alla segnalazione dei risultati provenienti da studi per la valutazione dei test diagnostici). I risultati erano i seguenti:

Studio in tre centri	LupoTek KCT	APTT
Percentuale di accordo positiva (per LA)	100%	87%
Percentuale di accordo negativa (per LA)	59%	15%
Percentuale di accordo complessiva	79%	50%

Le prestazioni di qualunque dosaggio sono influenzate dagli strumenti utilizzati e dalle pratiche di laboratorio. Ogni dosaggio deve essere revisionato in base ai singoli analizzatori in uso presso ciascun laboratorio secondo quanto previsto dalle linee guida CLSI EP15-A2 “User Verification of Performance for Precision and Trueness” (12) (Verifica delle prestazioni in termini di precisione ed esattezza da parte dell’utente) o da documenti similari.

BIBLIOGRAFIA

- Margolis J. The kaolin clotting time. A rapid one-stage method for diagnosis of coagulation defects. J.Clin.Pathol. 11:406-409, 1958.
- Exner T, Rickard KA, Kronenberg H. A sensitive test demonstrating lupus anticoagulant and its behavioural patterns. Br.J.Haematol. 40:143-151, 1978.
- Lesperance B., et al. Relative sensitivity of different tests in the detection of low titre lupus anticoagulants. Thromb. Haemostasis. 60: 217-219, 1988.
- Brandt JT, et al. Criteria for the diagnosis of Lupus Anticoagulants: An update. Thromb. Haemost. 74: 1185-1190, 1995.
- Rosner R, Pauzner R, Luský A. Detection and quantitative evaluation of lupus anticoagulant activity. Thromb.Haemostas. 57:144-147, 1987.
- Gibson J, Starling E, Date L,et al. Simplified screening procedure for detecting lupus inhibitors. J.Clin. Pathol. 41:225-231, 1988.
- H21-A5, “Collection, Transport, and Processing of Blood Samples for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition”, Clinical Laboratory Standards Institute, 2008.

- Exner T. Comparison of Two Simple Tests for Lupus Anticoagulant. Am. J. Clin. Path. 83: 215, 1985.
- Marques MB and Fritsma GA. Quick Guide to Coagulation Testing. AACCPress, 2006.
- McGlasson DL, Brey RL, Strickland DM, Patterson WR. Differences in kaolin clotting times and platelet counts resulting from variations in specimen processing. Clin.Lab.Sci. 2:109-110, 1989.
- EP5-A2, “Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods: Approved Guideline-Second Edition”, Clinical Laboratory Standards Institute, 2004
- EP15-A2, “User Verification of Performance for Precision and Trueness: Approved Guideline-Second Edition”, Clinical Laboratory Standards Institute, 2005.

VERSIONE ESPAÑOLA
USO PREVISTO

LupoTek KCT (tempo di coagulación per caolín) es un reactivo de tromboplastina parcial activada por caolín sin fosfolípidos. LupoTek KCT es un ensayo de detección de coagulación *in vitro* cualitativo para usarlo en laboratorios profesionales como ayuda en la detección de anticoagulantes lúpicos circulantes en plasma humano citratado.
RESUMEN

La prueba de tiempo de coagulación por caolín (PTTK), una prueba de tiempo de tromboplastina parcial activada que utiliza caolín como activador, se describió por primera vez en 1958 (1). El tiempo de coagulación por caolín formulado sin ningún fosfolípido añadido (KCT) se usó por primera vez para estudiar los anticoagulantes lúpicos (AL) en 1978 (2).

Se ha informado de que la prueba de KCT es la prueba más sensible para la detección de anticoagulantes circulantes como AL (3), y es una de las pruebas recomendadas por el ISTH para uso en el diagnóstico de AL (4).

PRINCIPIO

LupoTek KCT es un reactivo de tiempo de tromboplastina parcial activada sin fosfolípidos añadidos y con caolín como activador de contacto. En ausencia de fosfolípidos añadidos, el ensayo solo acelera escasamente la cascada de coagulación y es sensible a las coagulopatías en las vías de contacto y comunes.

REACTIVOS

Para uso diagnóstico *in vitro*

LupoTek KCT

Número de catálogo 87-305:

5 viales de 5 ml de reactivo KCT

5 viales de 5 ml de reactivo de cloruro de calcio 0,025 M

1. Reactivo KCT

Ingredientes: Cada vial de LupoTek KCT contiene 5 ml de un caolín de baja turbidez y asentamiento lento formulado con estabilidad coloidal mejorada, adecuado para pruebas de KCT automatizadas. El reactivo no contiene fosfolípidos.

Preparación para el uso: LupoTek KCT se proporciona como suspensión líquida, que se puede asentar tras el almacenamiento. Asegírese de que el reactivo esté completamente resuspendido y completamente mezclado antes del uso y durante el mismo.

2. Reactivo de cloruro de calcio

Ingredientes: Cada vial contiene 5 ml de cloruro de calcio 0,025 M estabilizado con azida sódica al 0,02 %.

Preparación para el uso: El reactivo de cloruro de calcio está envasado listo para su uso.

Almacenamiento y estabilidad de ambos reactivos: Los viales no abiertos son estables hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas si se almacenan entre 2 y 8 °C. La estabilidad de los viales abiertos es de 24 horas si se almacenan a temperatura ambiente.

ADVERTENCIA: AZIDA SÓDICA. La azida sódica puede formar azidas metálicas altamente explosivas si se expone al plomo o al cobre de las tuberías. Tales materiales solo se deben desechor por el desague dejando correr un gran volumen de agua para minimizar dicho riesgo.

Material es y equipo necesarios pero no proporcionados: Analizador de coagulación semiautomático o automático Equipo y materiales de laboratorio clínico habituales, como centrifugas, tubos de ensayo, pipetas y agua destilada.

Plasmas de control:

PlasmaCon N

PlasmaCon LA

RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

El plasma se obtiene a partir de sangre completa anticoagulada con 1 parte de citrato de sodio al 3,2 % por 9 partes de sangre completa. Procese la sangre completa recogida, realice un doble centrifugado del plasma y manipule el plasma según la pauta H21-A5 del CLSI (o edición posterior) (7).

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Póngase en contacto con r2 Diagnostics para consultar las aplicaciones validadas.

PRUEBAS DE MEZCLADO

Las pruebas de mezclado están recomendadas para el uso con el reactivo LupoTek KCT con el fin de distinguir entre deficiencias de factor e inhibidores relacionados con anticuerpos en pruebas de muestras fuera del intervalo normal (2). r² recomienda la mezcla 1:1 de plasma de pacientes y

plasma agrupado normal para la mayoría de los fines de prueba (6).

Los *pools* de plasmas normales (PPN) utilizados para los estudios de mezcla deben ser *pools* cuidadosamente preparados procedentes de donantes normales. El plasma de donantes se debe preparar de un modo parecido al de las muestras de pacientes. Se debe realizar un doble centrifugado o un filtrado a todos los plasmas para eliminar los fragmentos de plaquetas. El *pool* normal debe estar bien caracterizado para garantizar al menos una actividad del 75 % de todos los factores de coagulación. El *pool* normal se puede dividir en partes alícuotas y almacenarse a < -50 °C para proporcionar cierta normalización.

CONTROL DE CALIDAD

Las pruebas de control de calidad de la coagulación implican distintos componentes. Cada laboratorio debe establecer un programa de control de calidad que incluya plasmas de control tanto normales como anormales.

EXPRESIÓN DE RESULTADOS

El KCT de muestras puras de pacientes y de mezclas de muestras de pacientes y el PPN se pueden expresar como el tiempo de coagulación bruto en segundos.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Un tiempo de KCT anormal solo indica habitualmente un defecto de coagulabilidad de la muestra pura. Las pruebas de mezclado con PPN se realizan normalmente para diferenciar entre deficiencias de factor e inhibidores de anticuerpos. Las mezclas 1:1 que se recuperan dentro del rango normal del ensayo de KCT suelen indicar deficiencias de factor, mientras que las que siguen siendo anormales suelen indicar inhibidores relacionados con los anticuerpos.

Se requieren resultados adicionales con ensayos de factor, ensayos de anticoagulante lúpico dependiente de fosfolípidos o ensayos afectados por los anticuerpos como el ensayo Bethesda para determinar el diagnóstico final (6, 9). Ningún ensayo por sí mismo es definitivo para los anticoagulantes lúpicos. El diagnóstico de AL requiere un algoritmo que incluye varios ensayos (4).

LIMITACIONES:

La heparina interfiere con el KCT. La prueba de KCT no es apta para pacientes con tratamiento de heparina. Las muestras que contengan heparina o que se sospeche que estén contaminadas con heparina se deben analizar también con pruebas de tiempo de trombina y tiempo de reptilasa, o se deben tratar con heparinasis de acuerdo con los protocolos de laboratorio generalmente aceptados (9).

El KCT se puede prolongar debido a distintos estados clínicos, como deficiencias de factor o terapia anticoagulante oral. Se recomienda llevar a cabo estudios de mezcla para diferenciar entre estos estados y la inhibición similar a anticuerpos (6, 9).

La contaminación por plaquetas puede provocar problemas en los reactivos de TTPa con caolín y los reactivos de KCT, y puede reducir los tiempos de coagulación, sobre todo con plasma congelado-descongelado (10). Se debe realizar un doble centrifugado del plasma, sobre todo antes de su congelación.

No se ha evaluado el KCT para los pacientes sometidos a tratamiento con inhibidores directos de la trombina. No se ha evaluado el KCT en poblaciones pediátricas.

Las características de rendimiento de LupoTek KCT se han determinado mediante un analizador automático con un sistema de detección mecánica (Stago Compact). Póngase en contacto con r2 Diagnostics para consultar las aplicaciones del instrumento validadas.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Precisión: Las estimaciones de precisión de tres lotes de LupoTek KCT determinadas en una serie doble diaria, ejercicio durante veinte días con plasmas de control de calidad y normal y anormal (positivo en AL) como se describe en la pauta EP5-A2 del CLSI “Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods” (Evaluación del rendimiento de precisión de los métodos de medición cuantitativa) (11) en un Stago STA Compact. Los resultados de precisión medios como porcentaje del CV de los tiempos de coagulación fueron:

Plasma	Tiempo medio (segundos)	Repetibilidad	Total
Normal	61,8	1,2 %	2,2 %
Anormal	266,3	3,1 %	6,6 %

Interferencias: Los estudios de interferencias de LupoTek KCT se determinaron en el Stago STA Compact. El interferente se añadió al plasma normal agrupado (PNP) y se preparó una serie de dilución. La concentración máxima tolerada en el ensayo se definió como la concentración más alta de interferente en la que cualquier desplazamiento constante relativo al valor recuperado del tiempo de coagulación de PNP base fue inferior al 10 %. Las concentraciones máximas fueron:

Clase de interfe rente	Interferent e añadido	Concentrac ión máxima analizada	Concentració n máxima tolerada
Hemólisis	Hemoglobina	500 mg/dl	500 mg/dl
Ictericia	Bilirrubina no conjugada	20 mg/dl	20 mg/dl
Lipemia	IntraLipid®	2000 mg/dl triglicéridos	2000 mg/dl
Heparina	Heparina	2,0 unidades/ml	<0,1 unidades/ml

Intralipid® es una marca comercial registrada de Fresenius Kabi.

Intervalo de referencia normal: Se analizaron ciento treinta y un donantes normales con el STA Compact. Se calcularon la media geométrica y la desviación estándar de los tiempos de coagulación, y el intervalo se calculó como la media +/- 2 desviaciones estándar. El margen de perforación normal calculado fue de 49,2-90,7 segundos.

Estos valores se deben considerar únicamente orientativos. Cada laboratorio debe establecer su intervalo de referencia normal con sus propios instrumentos.

Comparación de métodos: Se analizaron un total de ciento ochenta muestras de pacientes con estado clínico conocido, incluidos pacientes con constancia de AL, en tres laboratorios con un lote de prueba de KCT y con Phospholin ES, un reactivo de TTPa sensible al AL. Cada muestra fue calificada como anormal para el KCT o el TTPa según con sus tiempos de coagulación brutos. Los acuerdos porcentuales positivo, negativo y total con el estado clínico se calcularon según el documento de pautas de la Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU. (FDA) 1620, "Statistical Guidance on Reporting Results from Studies Evaluating Diagnostic Tests" (Orientaciones estadísticas sobre la notificación de resultados procedentes de estudios de evaluación de pruebas diagnósticas). Los resultados fueron:

Estudio en tres centros	LupoTek KCT	TTPa
Acuerdo porcentual positivo (para AL)	100 %	87 %
Acuerdo porcentual negativo (para AL)	59 %	15 %
Acuerdo porcentual total	79 %	50 %

El rendimiento de cualquier ensayo está influido por los instrumentos en los que se ejecuta y por las prácticas del laboratorio. Cada ensayo se debe revisar para cada analizador en uso en cada laboratorio según las pautas EP15-A2 del CLSI "User Verification of Performance for Precision and Trueness" (Verificación por parte del usuario del rendimiento para precisión y certeza) (12) o con una pauta similar.

REFERENCIAS

- 1) Margolis J. The kaolin clotting time. A rapid one-stage method for diagnosis of coagulation defects. J.Clin.Pathol. 11:406-409, 1958.
- 2) Exner T, Rickard KA, Kronenberg H. A sensitive test demonstrating lupus anticoagulant and its behavioural patterns. Br.J.Haematol. 40:143-151, 1978.
- 3) Lesperance B., et al. Relative sensitivity of different tests in the detection of low titre lupus anticoagulants. Thromb. Haemostasis. 60: 217-219, 1988.
- 4) Brandt JT. et al. Criteria for the diagnosis of Lupus Anticoagulants: An update. Thromb. Haemost. 74: 1185-1190, 1995.

- 5) Rosner R, Pautzner R, Lusky A. Detection and quantitative evaluation of lupus anticoagulant activity. Thromb.Haemostas. 57:144-147, 1987.
- 6) Gibson J, Starling E, Date L, et al. Simplified screening procedure for detecting lupus inhibitors. J.Clin. Pathol. 41:225-231, 1988.
- 7) H21-A5, "Collection, Transport, and Processing of Blood Samples for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition", Clinical Laboratory Standards Institute, 2008.
- 8) Exner T. Comparison of Two Simple Tests for Lupus Anticoagulant. Am. J. Clin. Path. 83: 215, 1985.
- 9) Marques MB and Fritsma GA. Quick Guide to Coagulation Testing. AACC Press, 2006.
- 10) McGlasson DL, Brey RL, Strickland DM, Patterson WR. Differences in kaolin clotting times and platelet counts resulting from variations in specimen processing. Clin.Lab.Sci. 2:109-110, 1989.
- 11) EP5-A2, "Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods: Approved Guideline-Second Edition", Clinical Laboratory Standards Institute, 2004
- 12) EP15-A2, "User Verification of Performance for Precision and Trueness: Approved Guideline-Second Edition", Clinical Laboratory Standards Institute, 2005.

