



Ceveron® TGA RB Kit - English

INTENDED USE

Ceveron® TGA RB kit is used for determination of thrombin generation in human citrated plasma on Ceveron® alpha TGA. Ceveron® TGA RB trigger reagent is used for measurement of bleeding tendency, for monitoring therapy in haemophilia patients and for monitoring FVIII inhibitor bypassing therapy.

SUMMARY

Ceveron® TGA RB is based on monitoring the fluorescence generated by the cleavage of a fluorogenic substrate by thrombin over time, upon activation of the coagulation cascade in plasma by Ceveron® TGA RB trigger composed of tissue factor and negatively charged phospholipids.

The trigger composition is specially adapted to detect very sensitive changes in the positive feedback loop of intrinsic pathway activation upon activation of the extrinsic pathway, giving the assay high sensitivity to changes in the low range of FVIII and FIX levels.

From the changes in fluorescence over time, the concentration of thrombin (nM) in the sample can be calculated using the respective thrombin calibration curve. The increase in thrombin concentration over time allows the calculation of the thrombin generation curve and to calculate thrombin generation parameters.

REAGENTS

The Ceveron® TGA RB Kit contains:

mL	Reagent	Description
2 x 1	Ceveron® TGA RB	Trigger reagent with low concentration of phospholipid micelles containing rhTF in Tris-Hepes-NaCl buffer, lyophilized.
2 x 1.5	Ceveron® TGA BUF	Tris-Hepes-NaCl buffer, lyophilized.
2 x 3	Ceveron® TGA SUB	Fluorogenic substrate 1 mM Z-G-G-R-AMC, lyophilized.
2 x 1	Ceveron® TGA CONT H	Human plasma with increased thrombin generation, lyophilized.
2 x 1	Ceveron® TGA CONT L	Human plasma with decreased thrombin generation, lyophilized.
1 x 25	Calcium Chloride solution 25 mM	CaCl ₂ 25 mM, ready to use.

Material required (not supplied with the kit)

- Pipettes
- Distilled water

REF 5006347 Ceveron® TGA CAL Set

Warning and precautions

IVD - for in vitro diagnostic use.

Every single donor plasma and every lot of the controls included is tested and found negative for HbSag, HIV 1/2 antibodies and HCV antibodies. However, general precautions should be taken by handling all human source materials as potentially infectious.

A Material Safety Data Sheet for this product is available from www.technoclone.com

Stability and storage

The expiry date printed on the labels is only applicable to storage of the unopened containers at 2...8°C. Stability after reconstitution:

Reagent	Ceveron® alpha TGA	2...8°C
Ceveron® TGA RB	8 hours	5 days
Ceveron® TGA BUF	8 hours	5 days
Ceveron® TGA SUB	8 hours	5 days
Ceveron® TGA CONT H	4 hours	-
Ceveron® TGA CONT L	4 hours	-
CaCl ₂ 25 mM	7 days	4 weeks

Avoid contamination by microorganisms.

Plasmas should be frozen only once; during storage, the vials should be tightly capped.

Stability of the sample material:

Sample material	18...25°C	-20°C
Platelet poor plasma	4 hours	1 month

An immediate centrifugation after blood withdrawal is recommended. Further we recommend an immediate shock freezing of the centrifuged samples.

Attention! The frozen samples should be stored in a constant environment - avoid exposing the samples to variations in temperature. Before transportation we recommend to centrifuge and prepare the plasma samples.

TEST PROCEDURE

Preparation of samples

For Platelet poor plasma (PPP) separation, mix 9 parts of venous blood and 1 part sodium citrate solution (0.11 mol/L) and centrifuge for 15 minutes at a RCF of at least 2.500 x g (corresponding to DIN 58905).

Preparation of reagents

All lyophilized reagents of the Ceveron® TGA reagent kit must be dissolved in the volume of distilled water indicated on the vials. Reconstitution time is 20 minutes for the reagents and controls.

Vials with lyophilized reagents and distilled water used for reconstitution need to reach room temperature (18...25°C) before reconstitution.

Vials have to be mixed thoroughly to ensure that the whole material is resuspended. Mixing is performed best by careful upside-down movements of the vial. Vortex must be avoided as it would cause air bubbles in the reagent and these would disturb fluorescence measurement.

Special care has to be taken on substrate reconstitution. The lyophilized material is clear and can adhere to the wall of the vial. Make sure that the whole material is dissolved!

Before using the reagents, the vials need to be mixed again thoroughly by careful upside-down movements. Vortex must be avoided.

All reconstituted stored reagents should reach room temperature before use.

The validity of the test is checked by determination of controls. Please consult the lot specific batch table included in the kit for the reference ranges.

Performance of the test

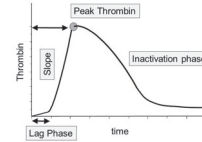
The Ceveron® TGA RB Kit is always used in combination with the Ceveron® TGA CAL Set.

Technoclone provides application sheets for Ceveron® alpha TGA. The application sheets contain analyser/assay specific handling and performance information. Please consult the instruction manual of the Ceveron® alpha.

To establish a calibration curve on Ceveron® alpha TGA use the Ceveron® TGA CAL Set. Follow the instructions from kit insert and from application sheet for Ceveron® alpha TGA.

Analysis of samples

The Ceveron® alpha TGA software calculates thrombin generation in the sample over time and the results are given in nM thrombin generated in the sample for each point of time during the whole coagulation process. The pattern seen resembles the figure provided. The following parameters can be used as readout:



- **Lag phase** from the time point when the TGA reagent including CaCl₂ is added until the first burst in thrombin formation
- **Peak thrombin**: Maximal concentration of thrombin formed
- **AUC**: Area under the curve

Normal range

Following normal ranges were determined testing 100 healthy normal donor PPP samples:

Reagent	nM Peak Thrombin	nM AUC
Ceveron® TGA RB Kit	43 – 368	1236 - 2945

It is recommended that each laboratory establish and controls its normal range. The evaluation and interpretation of patient results has to be made by specialized staff and the patients medical history has to be considered.

LIMITATION OF THE TEST

Reliable results can only be obtained when blood collection is standardized and follows the criteria of minimal activation of the clotting system during venipuncture. Care has to be taken during centrifugation of blood and plasma that only such plasma samples are used for the assays that comply with the requirements for the respective assays. In case of use of incorrect plasma samples interpretation of the results might become impossible. α2-MG-thrombin complexes formed during thrombin generation reaction do not influence the most important TGA parameter Peak Thrombin, but can lead to increase of AUC values. All types of anticoagulants influence thrombin generation parameters. Microparticles of different origin trigger thrombin generation, influencing the TGA parameters. Care has to be taken to avoid microparticle release during sample preparation and storage.

STANDARDISATION

The thrombin calibrator is calibrated against the Thrombin Reference Preparation of the WHO (see batch table).

LITERATURE

Please contact Technoclone www.technoclone.com or your local distributor.

Ceveron® TGA RB Kit - Deutsch

ANWENDUNG

Ceveron® TGA RB Kit dient zur Bestimmung der Thrombingenerierung in humanem Citratplasma am Ceveron® alpha TGA. Das Ceveron® TGA RB Kit wird zur Messung einer Blutungsneigung, zum Monitoring der Therapie bei Haemophilie oder einer FVIII Inhibitor Bypassing Therapie verwendet.

ZUSAMMENFASSUNG

Ceveron® TGA RB basiert auf der Messung der Änderung der Fluoreszenz, die bei der Spaltung eines fluorogenen Substrats durch Thrombin entsteht. Die Gerinnungskaskade wird durch die Zugabe des Triggers Ceveron® TGA RB, der aus einer Mischung von Tissue Faktor und negativ geladenen Phospholipiden besteht, aktiviert.

Durch die spezielle Zusammensetzung des Triggers können nach Aktivierung des exogenen Systems, sehr sensitiv Änderungen in der positive Rückkopplung des endogenen System erfasst werden, wodurch der Assay sehr sensitiv Änderungen der Faktoren VIII und IX speziell im niedrigen Konzentrationsbereich erfasst.

Aus der Änderung der Fluoreszenz im Zeitablauf kann die Thrombinkonzentration (nM) der Probe unter Verwendung der entsprechenden Thrombinkalibrationskurve berechnet werden. Die Zunahme der Thrombinkonzentration über die Zeit erlaubt es die Thrombingenerierungskurve und die Parameter der Thrombingenerierung zu berechnen.

REAGENZEN

Das Ceveron® TGA RB Kit enthält:

mL	Reagenz	Beschreibung
2 x 1	Ceveron® TGA RB	Trigger Reagenz mit niedriger Konzentration von Phospholipid Myzellen und rhTF in Tris-Hepes-NaCl Puffer, lyophilisiert.
2 x 1,5	Ceveron® TGA BUF	Tris-Hepes-NaCl Puffer, lyophilisiert.
2 x 3	Ceveron® TGA SUB	Fluorogenes Substrat 1 mM Z-G-G-R-AMC, lyophilisiert.
2 x 1	Ceveron® TGA CONT H	Humanes Plasma mit erhöhter Thrombingenerierung, lyophilisiert.
2 x 1	Ceveron® TGA CONT L	Humanes Plasma mit verminderter Thrombingenerierung, lyophilisiert.
1 x 25	Calcium Chloride solution 25 mM	Calciumchlorid Lösung 25 mM, gebrauchsfertig.

Benötigtes Material (nicht im Kit enthalten)

- Pipetten
- Destilliertes Wasser

REF 5006347 Ceveron® TGA CAL Set

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Nur zur Anwendung als in vitro Diagnostikum

Jede Reagenziencharge der Kontrollen und jedes hierzu verwendete Einzelplasma ist HbSag, HIV 1/2 Ak und HCV Ak negativ. Alle humanen Blut- bzw. Plasmaprodukte und Proben müssen als potenziell infektiös angesehen werden. Sie sind mit der notwendigen Sorgfalt und entsprechend den Sicherheitsvorschriften zu behandeln

Ein Sicherheitsdatenblatt kann von www.technoclone.com heruntergeladen werden.

Lagerung und Stabilität

Das Reagenz ist ungeöffnet bei 2...8°C zu lagern und bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Datum verwendbar. Stabilität nach Rekonstitution:

Reagenz	Ceveron® alpha TGA	2...8°C
Ceveron® TGA RB	8 Stunden	5 Tage
Ceveron® TGA BUF	8 Stunden	5 Tage
Ceveron® TGA SUB	8 Stunden	5 Tage
Ceveron® TGA CONT H	4 Stunden	-
Ceveron® TGA CONT L	4 Stunden	-
CaCl ₂ 25 mM	7 Tage	4 Wochen

Kontamination mit Mikroorganismen soll vermieden werden.

Das Plasma kann nur einmal eingefroren werden; während der Lagerung müssen die Fläschchen fest verschraubt sein.

Stabilität des Probenmaterials:

Probenmaterial	18...25°C	-20°C
Platelet poor plasma	4 Stunden	1 Monat

Plasmaproben die gelagert werden, sollen gleich tiefgefroren werden. Wir empfehlen die Proben gleich nach der Blutabnahme zu zentrifugieren.

Bitte beachten Sie! Die tiefgefrorenen Plasmaproben sollten bei konstanter Temperatur gelagert werden – vermeiden Sie es, die gefrorenen Plasmaproben Temperaturschwankungen auszusetzen. Die Proben sollten erst nach der Zentrifugation transportiert werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

Vorbereitung der Proben

Zur Gewinnung von Plättchenarmen Plasma (PPP) werden 9 Teile venöses Blut mit 1 Teil Natriumcitrat-Lösung (0,11 mol/L) gemischt und bei mind. 2500 x g 15 Minuten lang zentrifugiert (DIN 58905).

Vorbereitung der Reagenzien

Alle lyophilisierten Reagenzien des Ceveron® TGA CAL Sets und des Ceveron® TGA Reagenz Kits müssen mit dem auf den Etiketten des jeweiligen Reagenzes angegebenen Volumen Aqua dest. gelöst werden. Die Rekonstitutionszeit ist 20 Minuten für die Reagenzien und Kontrollen.

Alle lyophilisierten Reagenzien einschließlich Aqua dest. sollen vor Gebrauch Raumtemperatur (18...25 °C) erreicht haben.

Um sicherzustellen, dass das ganze Reagenz rekonstituiert wird, soll das Fläschchen gründlich gemischt werden. Das Mischen wird am besten durch gründliches über Kopf Schwenken des Fläschchens erreicht. Vortexen soll vermieden werden, da Luftblasen entstehen können, welche die Fluoreszenzmessung stören.

Bei der Rekonstitution des Substrates muss besonders darauf geachtet werden das gesamte Lyophilisat zu lösen. Das lyophilisierte Substrat ist klar und kann an der Wand des Fläschchens haften. Sorgen Sie dafür das Reagenz vollständig zu lösen!

Bevor die Reagenzien verwendet werden, müssen die Fläschchen erneut durch über Kopf Schwenken gründlich gemischt werden.

Gelagerte, bereits rekonstituierte Reagenzien sollen vor Gebrauch Raumtemperatur erreicht haben.

Die Validität der Messungen wird mit den Kontrollen überprüft. Bitte beachten Sie die lotspezifischen Referenzbereiche und entnehmen Sie diese der im Kit beigelegten Wertetabelle.

Testdurchführung

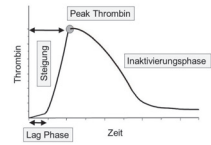
Das Ceveron® TGA RB Kit wird immer zusammen mit dem Ceveron® TGA CAL Set verwendet.

Technoclone stellt Applikationen für die Ceveron® TGA Kits zur Verfügung. Die Applikationen enthalten Analyzer/Assay spezifische Gebrauchs- und Durchführungsinformationen. Beachten Sie auch die Informationen des Ceveron® alpha TGA Handbuchs.

Um eine Kalibrationskurve am Ceveron® alpha TGA zu erstellen wird das Ceveron® TGA CAL Set verwendet. Befolgen Sie die Anweisungen des Ceveron® TGA CAL Set Beipacktextes und der Ceveron® alpha TGA Applikation.

Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung erfolgt automatisch durch die Ceveron® alpha Auswertesoftware. Die Software berechnet die Thrombingenerierung in der Probe in Abhängigkeit von der Zeit und die Ergebnisse werden in nM Thrombin für jeden Zeitpunkt des gesamten Gerinnungsprozesses angegeben. Es ergibt sich ein der folgenden Abbildung analoger Verlauf. Neben der grafischen Darstellung der Thrombingenerierung werden folgende Parameter berechnet:



- **Lag phase:** Latenzzeit von der Reagenzzugabe inclusive CaCl₂ bis zur ersten massiven Thrombinbildung
- **Peak thrombin:** Maximale Thrombinbildung
- **AUC:** Fläche unter der Kurve

Normalbereich

Folgende Normalwerte sind in 100 PPP Proben von gesunden Normalspendern bestimmt worden:

Reagent	nM Peak Thrombin	nM AUC
Ceveron® TGA RB Kit	43 – 368	1236 - 2945

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Normalbereich bestimmt. Die Beurteilung und Interpretation der serologischen Ergebnisse darf nur durch entsprechendes Fachpersonal erfolgen. Dabei muss die Patientenanamnese berücksichtigt werden.

TESTEINSCHRÄNKUNGEN

Eine wesentliche Voraussetzung, um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, ist die standardisierte Blutabnahme, die den Kriterien für eine minimale Aktivierung des Gerinnungssystems während der Venenpunktion entspricht. Es ist unbedingt darauf zu achten, dass die Zentrifugationsschritte kontrolliert durchgeführt werden, und nur solche Plasmen verwendet werden, die die Anforderungen des entsprechenden Tests erfüllen. Die Verwendung ungeeigneter Plasmaproben kann die Interpretation der Ergebnisse unter Umständen unmöglich machen. Die während der Thrombingenerierung gebildeten α2-MG-Thrombin Komplexe beeinflussen den wichtigsten TGA Parameter das Peak Thrombin nicht, können aber zu einem erhöhten AUC Wert führen. Alle Antikoagulantien haben einen Einfluss auf die TGA Parameter. Mikropartikel verschiedenen Ursprungs aktivieren die Thrombingenerierung und beeinflussen damit die TGA Parameter. Es muss vermieden werden, dass Mikropartikel während der Probengewinnung und Lagerung freigesetzt werden.

STANDARDISIERUNG

Der Thrombinkalibrator wurde gegen die aktuelle WHO Referenzpräparation kalibriert (siehe Wertetabelle).

LITERATUR

Bitte wenden Sie sich an Technoclone www.technoclone.com oder an Ihren Händler

	<p>manufacturer / Hersteller / fabricante / fabricant / fabricant / fabricant / Tillverkaren / Fabrikanten / Producent / Κατασκευαστής / Производите / Производител / výrobce / Proizvođač</p>	IVD	<p>in vitro diagnostic use / in vitro Diagnostikum / diagnóstico in vitro / diagnóstico en vitro / diagnóstico in vitro / diagnostic in vitro / for in vitro diagnostic / in vitro diagnostik / in vitro diagnostik bruk / при использовании in vitro / за ин vitro диагностика / pro in vitro diagnostiku / использовать для диагностики in vitro / diagnosticky prostředek in vitro / in vitro dijagnostika</p>
	<p>storage temperature / Lagertemperatur / temperatura di conservazione / temperatura de conservación / temperatura de conservação / température de stockage / lagringstemperatur / orbeavningstemperatur / Orbeavningstemperatur / θερμοκρασία αποθήκευσης / съхранение на / teplota skladování / температура хранения / teplota skladování / Temperatura lagerovnja</p>	LOT	<p>lot / Charge / lotto / lote / lote / lot / sats / serie / Parti / партия / партида номер / sarže / lot / sarže / Serija</p>
	<p>expiry date / Verfallsdatum / data di scadenza / fecha de caducidad / data de validade / date d'expiration / utgångsdatum / udløbsdato / Utløbsdato / Ημερομηνία λήξης / срок годности / datum expirace / срок годности / datum expirace / Rok trajanja</p>	REF	<p>catalogue number / Katalognummer / numero di catalogo / número de catálogo / número de referencia / réf. de catalogue / katalognummer / Katalognummer / αριθμός καταλόγου / каталожный номер / katalogové číslo / каталожный номер / katalogové číslo / Kataloški broj</p>
	<p>consult instructions for use / Gebrauchsanweisung beachten / consultare le istruzioni per l'uso / consulte las instrucciones de uso / consulter o manual de instruções / instruction d'utilisation / se användarinstruktioner / følg brugsvejledning / Følg bruksanvisningen / συμβουλευθείτε τις οδηγίες για τη χρήση / прочитайте инструкцию за работа / прочитајте се инструкцијом / перед использованием читайте инструкцию / sledujte návod k použití / Pročitaj upustvo pre upotrebe</p>	GTIN	<p>Global Trade Item Number / Globale Artikelnummer / número mundial de artículo comercial / Número global de item comercial / code article international / Кодовός Προϊόντος Διεθνούς Εμπορίου / Общ. Товарен Код / Номер на продукт / Глобалниот трговниот номер единици / Celosvětový katalogové číslo / Mednarodni trgovački broj artikl</p>
	<p>Biological risk / Biologisches Risiko / Rischio biologico / Riesgo biológico / Risco biológico / Risque biologique / Biologisk risk / Biologisk risiko / Biologisk risiko / Биологичен риск / Биологически риск / Biologické riziko / biološka rizik</p>	BUF	<p>Buffer / Puffer / tampone / tampón / Tampão / tampon / Buffert / Buffer / Buffer / буферный διάλυμα / буфер / буфер / Puffer / Puffer</p>
	<p>CE-mark / CE-Kennzeichnung / marchio CE / marca de CE / Símbolo da CE / marquage CE / CE-märkning / CE-merket / CE-merke / CE-σημάδι / CE марка / CE-označení / маркировка CE / značka CE / CE-marka</p>	SUB	<p>Substrate / Substrat / substrato / substrato / substrato / substrat / Substrat / Substrat / Substrat / Substrat / υποστρώμα / Субстрат / Субстрат / Substrát / Substrat</p>
	<p>Determinations / Bestimmungen / determinazioni / determinaciones / determinações / déterminations / bestämningar / bestemmelser / Bestemmelser / прообидирујоци / брой тестове / stanovení / определений / počet stanovení / Definicija</p>	CONT	<p>Control / Kontrolle / controllo / control / control / contrôle / Kontroll / Kontroll / Kontroll / διάλυμα ελέγχου / Контроль / Контрольный образец / Kontrola / Kontrola</p>