

# Ceveron® TGA

For research use only








### Modular reagents:

REF	5006202	Ceveron® TGA RB	5 x 1 mL
REF	5006204	Ceveron® TGA RB	50 x 1 mL
REF	5006224	Ceveron® TGA RC Low	5 x 1 mL
REF	5006225	Ceveron® TGA RC Low	50 x 1 mL
REF	5006227	Ceveron® TGA RC High	5 x 1 mL
REF	5006228	Ceveron® TGA RC High	50 x 1 mL
REF	5006237	Ceveron® TGA SUB	5 x 3 mL
REF	5006239	Ceveron® TGA SUB	50 x 3 mL
REF	5006362	Ceveron® TGA CAL BUF	5 x 3 mL
REF	5006370	Ceveron® TGA BUF	5 x 1 mL
REF	5006372	Ceveron® TGA BUF	50 x 1 mL
REF	5277017	CaCl <sub>2</sub> 25 mmol/L	25 mL

### Calibrator and Controls:

REF	5006347	Ceveron® TGA CAL Set	1 Set
REF	5006322	Ceveron® TGA Control-High	5 x 1 mL
REF	5006332	Ceveron® TGA Control-Low	5 x 1 mL

### Symbols key / Symbolschlüssel

	Manufactured by / Hergestellt von		determinations/ Bestimmungen	<b>DIL</b>	dilute or dissolve in / verdünnen oder lösen in
	expiry date / Verfallsdatum	<b>AQUA</b>	Distilled water / destilliertes Wasser	<b>LOT</b>	lot / Charge
	Storage Temperature / Lagertemperatur	<b>BUF</b>	buffer / Puffer	<b>REF</b>	Catalogue number / Katalognummer
	Consult Instructions for use / Gebrauchsanweisung beachten	<b>CAL</b>	calibrator / Kalibrator	<b>RUO</b>	research use only / nur für Forschungszwecke
		<b>CONT</b>	control / Kontrolle	<b>SUB</b>	substrate / Substrat



**PRODUCT DESCRIPTION**

**INTENDED USE**

The Ceveron® TGA reagents are an assay system for determination of thrombin generation over time in **platelet poor or platelet rich plasma** (PPP or PRP) upon activation of the clotting cascade by micelles of negatively charged phospholipids containing different amounts of human tissue factor and CaCl<sub>2</sub>. The kit can be used to monitor hemophiliacs during inhibitor bypassing therapy, to monitor anticoagulation therapy, to calculate INR values for samples and to determine states of bleeding disorders or thrombophilia as well as the activity of circulating micro particles. This broad range of applications is possible by providing different tissue factor concentrations and by monitoring the whole kinetic of thrombin generation during initiation, amplification and down regulation of thrombin formation. TGA is therefore a universal assay for analyzing and monitoring the function of the haemostatic system.

**TEST PRINCIPLE**

Ceveron® TGA is based on monitoring the fluorescence generated by the cleavage of a fluorogenic substrate by thrombin over time upon activation of the coagulation cascade by different concentrations of tissue factor and negatively charged phospholipids in plasma. 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 with time then allows to calculate generation of thrombin in the sample and to plot such thrombin values over time for the whole coagulation process. This then results in the visualization of the different phases of clot formation.

**COMPOSITION**

The Ceveron® TGA reagents contain:

mL	reagent	description
3	Ceveron®TGA substrate (SUB)	Fluorogenic substrate 1 mM Z-G-G-R-AMC
3	Ceveron®TGA CAL BUF	Hepes-NaCl-buffer containing 0.5 % bovine serum albumin
1	Ceveron®TGA BUF	Tris-Hepes-NaCl buffer
0.5	Ceveron®TGA CAL	~1.000 nM thrombin in buffer with BSA
1	Ceveron®TGA reagent B (RB)	RB low conc. of phospholipid micelles containing low rTF in Tris-Hepes-NaCl buffer
1	Ceveron®TGA reagent C (RC) Low	RC Low conc. of phospholipid micelles containing rTF in Tris-Hepes-NaCl buffer
1	Ceveron®TGA reagent C (RC) High	RC High conc. of phospholipid micelles containing rTF in Tris-Hepes-NaCl buffer
1	Ceveron®TGA control High (CONT H)	Human plasma with increased thrombin generation, lyophilized.
1	Ceveron®TGA control Low (CONT L)	Human plasma with decreased thrombin generation, lyophilized.

The reagents are available in packs of 5 and 50 vials.

The Ceveron® TGA CAL Set contains:

mL	reagent	description
1 x 3	Ceveron®TGA CAL BUF	Hepes-NaCl-buffer containing 0,5 % bovine serum albumin
1 x 1	Ceveron®TGA BUF	Tris-Hepes-NaCl buffer
1 x 0.5	Ceveron®TGA CAL	~1.000 nM thrombin in buffer with BSA

**MATERIAL REQUIRED** (not supplied with the kit)

- Pipettes
- Distilled water
- Buffer

REF 5277017 CaCl<sub>2</sub> 25 mmol/L 25 mL

**WARNING AND PRECAUTIONS**

- for research use only
- Every single donor plasma and every lot of the controls included is tested and found negative for Hb<sub>s</sub>Ag, HIV 1/2 antibodies and HCV antibodies. However, general precautions should be taken by handling all human source materials as potentially infectious.

**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	RT* (20...25°C)	12 °C (Ceveron®)	+2...8°C	-20°C
TGA SUB	1 week	2 weeks	1 month	6 months

Reagent	RT* (20...25°C)	RT* (Ceveron®)	+2...8°C	-20°C
Ceveron®TGA CAL BUF	8 hours	8 hours	1 week	1 month
Ceveron®TGA BUF	8 hours	8 hours	1 week	1 month
Ceveron®TGA CAL	8 hours	8 hours	1 week	6 months
Ceveron®TGA RB, RCL and RCH	8 hours	8 hours	1 week	6 months
Ceveron®TGA CONT L and CONT H	4 hours	4 hours	8 hours	1 month

Avoid contamination by micro-organisms.

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

Stability of the sample material: \* room temperature

Sample material	RT* (20...25°C)	+2...8°C	-20°C
PPP, PRP and PFP Plasma	2 hours	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 samples.

**TEST PROCEDURE**

**PREPARATION OF SAMPLES**

In the Ceveron® TGA assay citrated plasma (platelet rich, platelet poor or platelet free) can be used, depending on the specific application.

For plasma 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).

For special requirements, preparation of other plasmas might be necessary:

- for *platelet rich plasma (PRP)* centrifuge for 5 minutes at 100 x g and carefully pipette off the obtained PRP;
- for *platelet poor plasma (PPP)* centrifuge PRP for 10 minutes at 1.500 x g and carefully pipette off the obtained PPP;

for *platelet and micro particle free plasma (PFP)*, centrifuge PPP for 30 minutes at 15.000 x g and carefully pipette off the obtained PFP or use the Technoclone micro particle filtration unit.

**PREPARATION OF REAGENTS**

The lyophilized reagents must be dissolved in the volume of distilled water indicated on the vials. All reconstituted reagents should **reach room temperature before use**.

After 15 min of reconstitution time and thorough mixing, reagents are ready to use.

**PERFORMANCE OF THE TEST - CEVERON® Alpha TGA**

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

**THROMBIN CALIBRATION CURVE**

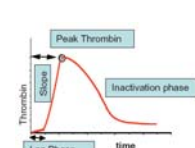
The Ceveron® TGA CAL Set includes a description how to establish a Ceveron® alpha TGA CAL Curve.

**STANDARDIZATION**

The thrombin calibrator is calibrated against the thrombin Reference Preparation of the WHO.

**ANALYSIS OF SAMPLES**

The Ceveron® alpha 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 below. The following parameters can be used as readout in our software:



1. **Lag phase** from the time point when the TGA reagent including CaCl<sub>2</sub> is added until the first burst in thrombin formation
2. **Slope**: Steepest rate of thrombin formation per minute. Calculated by the software as VCI

$$\text{Velocity Index} = \frac{\text{peak thrombin}}{\text{peak time} - \text{lag time}}$$

3. **Peak thrombin**: Maximal concentration of thrombin formed
4. **AUC**: Area under the curve

Slope and peak thrombin can depend on the amount of phospholipids present in the sample. Since the provided amount of phospholipids in reagents RB and RC Low is limited this value is determined in PPP by the number and composition of micro particles present in the sample. In most instances there is a good correlation between slope and peak thrombin. Both parameters also depend on the amplification of initial thrombin generated and are higher in states of thrombophilia and decreased during anticoagulation therapy or in samples with bleeding disorders. We recommend the following applications:

Reagent	Purpose
TGA RB	- to monitor inhibitor bypass therapy with FEIBA and rFVIIa in hemophiliacs with Factor VIII inhibitors - measurement of <b>thrombophilia tendency</b> (preferentially in standard PPP plasma)
TGA RC Low	- measurement of <b>bleeding tendency</b> - <b>hF VII, hF Xa, hF XIa</b>
TGA RC High	- monitoring <b>anticoagulation therapy</b>

**NORMAL RANGE**

It is recommended that each laboratory establish and controls its normal range.

**REFERENCE RANGE**

It is important to note that the controls included in the kit contain an average amount of circulating micro particles also found in a normal population and cannot be used as PFP controls. Micro particle free normal controls can be purchased separately.

Please consult the lot specific batch table included in the kit for the reference ranges.

**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.

**LITERATURE**

For literature please consult our website [www.technoclone.com](http://www.technoclone.com).

**PRODUKTBESCHREIBUNG**

**ANWENDUNG**

Die Ceveron® TGA Reagenzien dienen zur Bestimmung der Thrombingerieung im Zeitablauf in **plättchenarmem (PPP) oder plättchenreichem (PRP)** Plasma, nachdem die Gerinnungskaskade durch Phospholipidmicellen, die verschiedene Mengen an Tissue Faktor und CaCl<sub>2</sub> enthalten, aktiviert wird. Der Testkit kann zum Monitoring von Hämophilie- Patienten während einer Inhibitor-Bypass Therapie ebenso verwendet werden, wie zum Monitoring einer Antikoagulationstherapie mit Berechnung der INR Werte oder zur Bestimmung von Gerinnungsstörungen wie Blutungsneigungen oder Thrombophilien. Auch eine Bestimmung der Aktivität zirkulierender Mikropartikel ist möglich. Dieser breite Anwendungsbereich wird sowohl durch die Bereitstellung verschiedener Tissue Faktor Konzentrationen erreicht, als auch durch die Verfolgung des gesamten Verlaufs der Thrombingerieung während Initiation, Amplifikation und Inhibierung der Thrombinbildung.

**TESTPRINZIP**

Ceveron® TGA basiert auf der Messung der Änderung der Fluoreszenz, die bei der Spaltung eines fluorogenen Substrats durch Thrombin entsteht. Die Gerinnungskaskade wird durch die Zugabe verschiedener Konzentrationen von Tissue Faktor und negativ geladenen Phospholipiden aktiviert. 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 dann die Thrombingerieung pro Minute zu berechnen und solche Thrombinwerte für den gesamten Gerinnungsprozess gegen die Zeit aufzutragen. Damit ist es möglich die verschiedenen Phasen der Thrombinbildung graphisch darzustellen.

**ZUSAMMENSETZUNG**

Die Ceveron® TGA Reagenzien enthalten:

mL	Reagenz	Beschreibung
3	Ceveron®TGA substrate (SUB)	Fluorogenes Substrat 1 mM Z-G-G-R-AMC
3	Ceveron®TGA CAL BUF	Hepes-NaCl-Puffer mit 0,5 % BSA
1	Ceveron®TGA BUF	Tris-Hepes-NaCl Puffer
0.5	Ceveron®TGA CAL	~1.000 nM Thrombin in Puffer in BSA
1	Ceveron®TGA reagent B (RB)	RB niedrig konzentrierte Phospholipid-Micellen mit rhTF in Tris-Hepes-NaCl Puffer
1	Ceveron®TGA reagent C (RC) Low	RCL niedrig konzentrierte Phospholipid-Micellen rhTF in Tris-Hepes-NaCl Puffer
1	Ceveron®TGA reagent C (RC) High	RCH hoch konzentrierte Phospholipid-Micellen rhTF in Tris-Hepes-NaCl Puffer
1	Ceveron®TGA control High (CONT H)	Humanes Plasma mit erhöhter Thrombingerieung, Iyo.
1	Ceveron®TGA control Low (CONT L)	Humanes Plasma mit verminderter Thrombingerieung, Iyo.

Die Reagenzien sind in den Packungsgrößen von 5 oder 50 Fläschchen erhältlich. Das Ceveron® TGA CAL Set enthält:

mL	Reagenz	Beschreibung
1 x 3	Ceveron®TGA CAL BUF	Hepes-NaCl-Puffer mit 0,5 % BSA
1 x 1	Ceveron®TGA BUF	Tris-Hepes-NaCl Puffer
1 x 0.5	Ceveron®TGA CAL	~1.000 nM Thrombin in Puffer in BSA

**BENÖTIGTE MATERIAL** (nicht im Testkit enthalten)

- Pipetten - Destilliertes Wasser - Puffer

REF	5277017	CaCl <sub>2</sub> 25 mmol/L	25 mL
-----	---------	-----------------------------	-------

**WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN**

- Nur für Forschungszwecke
- 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

**LAGERUNG UND STABILITÄT**

Die Reagenzien sind ungeöffnet bei +2...+8°C zu lagern und bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Datum verwendbar.

Stabilität nach Rekonstitution:

Reagenz	RT* (20...25°C)	12 °C (Ceveron®)	+2...8°C	-20°C
Ceveron®TGA SUB	1 Woche	2 Wochen	1 Monat	6 Monate

Reagenz	RT* (20...25°C)	RT* (Ceveron®)	+2...8°C	-20°C
Ceveron®TGA CAL BUF	8 Stunden	8 Stunden	1 Woche	1 Monat
Ceveron®TGA BUF	8 Stunden	8 Stunden	1 Woche	1 Monat
Ceveron®TGA CAL	8 Stunden	8 Stunden	1 Woche	6 Monate
Ceveron®TGA RB, RCL and RCH	8 Stunden	8 Stunden	1 Woche	6 Monate
Ceveron®TGA CONT L und CONT H	4 Stunden	4 Stunden	8 Stunden	1 Monat

Kontamination durch Mikroorganismen ist zu vermeiden. Das Plasma darf nur einmal eingefroren werden. Während der Lagerung sollte die Schutzkappe fest verschlossen sein.

Stabilität des Probenmaterial: \* Raumtemperatur

Probenmaterial	RT* (20...25°C)	+2...8°C	-20°C
PPP, PRP und PFP Plasma	2 Stunden	4 Stunden	1 Monat

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

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

**TESTDURCHFÜHRUNG**

**VORBEREITUNG DER PROBEN**

Für den Ceveron® TGA Test kann entsprechend der spezifischen Anwendung Citratplasma, vorzugsweise in CTAD Röhren, (Plättchenreich, -arm oder -frei) verwendet werden. Zur Plasmagewinnung 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).

Für spezielle Anwendungen kann eine andere Plasmapräparation erforderlich sein:

- für **plättchenreiches Plasma (PRP)** 5 Minuten bei 100 x g zentrifugieren und das so gewonnene PRP vorsichtig abpipettieren;
- für **plättchenarmes Plasma (PPP)** das PRP 10 Minuten lang bei 1500 x g zentrifugieren und das so gewonnene PPP vorsichtig abpipettieren;
- für **Plättchen- und Mikropartikel freies Plasma (PFP)** das PPP 30 Minuten lang bei 15000 x g zentrifugieren und das so gewonnene PFP vorsichtig abpipettieren oder durch Verwendung der Technoclone Mikropartikel Filtrations-Einheit.

**VORBEREITUNG DER REAGENZIEN**

Die lyophilisierten Reagenzien müssen mit dem auf den Etiketten des jeweiligen Reagenzes angegebenen Volumen Aqua dest. gelöst werden. Alle gelösten Reagenzien einschließlich Aqua dest. sollen **vor Gebrauch Raumtemperatur** erreicht haben.

**Nach genau 15 min Rekonstitutionszeit** und sorgfältigem Mischen (Vortex) können die Reagenzien verwendet werden

**TESTDURCHFÜHRUNG - CEVERON® Alpha TGA**

Bitte beachten Sie die Hinweise im Benutzerhandbuch und/oder in den Testapplikationen für den Ceveron® alpha TGA für den gesamten Testablauf. **Hinweis:** Nach TGA Messungen müssen die Pipettieradnadeln gewaschen werden (priming). Die Software beinhaltet: Thrombinkalibrationskurve und Auswertung der Ergebnisse.

**THROMBINKALIBRATIONSKURVE**

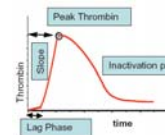
Im Ceveron® TGA CAL Set ist eine Beschreibung beigelegt, wie eine TGA Kalibration mit dem Ceveron® alpha erstellt wird.

**STANDARDISIERUNG**

Der Thrombinkalibrator wurde gegen die aktuelle WHO Referenzpräparation kalibriert.

**AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE**

Die Auswertung erfolgt automatisch durch die Ceveron® alpha Auswertesoftware. Die Software berechnet die Thrombingerieung in der Probe in Abhängigkeit von der Zeit und die Ergebnisse werden in nM Thrombin für jeden Zeitpunkt des gesamten Gerinnungsprozesses angegeben. Nach Aktivierung der Gerinnung in der Probe durch Zugabe von CaCl<sub>2</sub> und der Phospholipid/Tissue Faktor Mischung wird die Bildung von Thrombin nach einer Lag Phase initiiert; danach nimmt die Thrombingerieung pro min. stetig zu, erreicht ein Maximum und nimmt danach wieder ab. Es ergibt sich ein der folgenden Abbildung analoger Verlauf:  
Neben der grafischen Darstellung der Thrombingerieung werden folgende Parameter berechnet:



1. Die **Latenz (Lag) Phase** vom Zeitpunkt der Reagenz-Zugabe bis zur massiven Thrombinbildung
2. Die **Steigung**: höchste Rate der Thrombinbildung pro Minute, die in der Software mittels Velocity Index berechnet wird

$$\text{Velocity Index} = \frac{\text{peak thrombin}}{\text{peak time} - \text{lag time}}$$

3. **Peak thrombin**: maximale Thrombinbildung
4. **AUC**: Fläche unter der Kurve (area under the curve)

Die Dauer der Lag Phase hängt in der Regel von der Menge des zugegebenen Tissue Faktors ab und damit von der Art des verwendeten TGA Reagenz (RC Low, RC High und RD). Steigung und Peak hängen auch von der Menge an Phospholipiden ab, die in der Probe enthalten sind. Da die Phospholipidkonzentration in den TGA Reagenzien (RB und RC Low) limitiert ist, hängen diese Werte in plättchenarmem Plasma von Zahl und Zusammensetzung der in der Probe vorhandenen Mikropartikel ab. In den meisten Fällen ergibt sich eine gute Korrelation zwischen Steigung und Peak Thrombin. Beide Parameter hängen auch von der Amplifikation des generierten Thrombins ab und sind bei Thrombophilien erhöht und in der Antikoagulationstherapie oder bei Blutungsübel erniedrigt. Wir empfehlen folgende Reagenzien zur Bestimmung von:

Reagenz	Zweck
TGA RB RC Low	- Messung einer <b>Thrombosegenieung</b> (bevorzugt plättchenarmes Plasma PPP) - Messung einer <b>Blutungsneigung</b> - für das Monitoring einer <b>FVIII Inhibitor Bypass Therapie mit FEIBA und/oder rFVIIa</b> - hF VII, hF Xa, hF XIa
TGA RC High	- Monitoring einer <b>oralen Antikoagulationstherapie</b>

**NORMALBREICH**

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

**REFERENZBEREICH**

Es ist zu beachten, dass die Kontrollen des Testkits durchschnittliche Mengen zirkulierender Mikropartikel enthalten und nicht als Kontrollen für plättchenfreie Proben verwendet werden können.

Bitte beachten Sie die lotspezifischen Referenzbereiche und entnehmen Sie diese der im Kit beigelegten Wertetabelle.

**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. Ungenaue Ergebnisse können Ihre Ursache in inhomogener oder defekter Platten, unpräzises Pipettieren sowie einem verzögertem Beginn der Messung nach dem Pipettieren des Substrates haben.

**LITERATUR**

Für Literaturhinweise besuchen Sie bitte unsere Webseite [www.technoclone.com](http://www.technoclone.com)

