

TECHNOTHROMBIN[®] TGA

For research use only



Complete reagent kit:

REF 5006010 TECHNOTHROMBIN[®] TGA Kit








Modular reagents:

REF 5006209	TECHNOTHROMBIN [®] TGA RB	5 x 0.5 mL
REF 5006210	TECHNOTHROMBIN [®] TGA RB	50 x 0.5 mL
REF 5006212	TECHNOTHROMBIN [®] TGA RC Low	5 x 0.5 mL
REF 5006213	TECHNOTHROMBIN [®] TGA RC Low	50 x 0.5 mL
REF 5006214	TECHNOTHROMBIN [®] TGA RC High	5 x 0.5 mL
REF 5006216	TECHNOTHROMBIN [®] TGA RC High	50 x 0.5 mL
REF 5006220	TECHNOTHROMBIN [®] TGA RD	5 x 1.5 mL
REF 5006222	TECHNOTHROMBIN [®] TGA RD	50 x 1.5 mL
REF 5006235	TECHNOTHROMBIN [®] TGA SUB	5 x 1.5 mL
REF 5006230	TECHNOTHROMBIN [®] TGA SUB	50 x 1.5 mL

Controls and Calibrator:

REF 5006320	TECHNOTHROMBIN [®] TGA Control High (CH)	5 x 1 mL
REF 5006330	TECHNOTHROMBIN [®] TGA Control Low (CL)	5 x 1 mL
REF 5006345	TECHNOTHROMBIN [®] TGA CAL Set	1 Set

Symbols key / Symbolschlüssel

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



PRODUCT DESCRIPTION

INTENDED USE

The TECHNOTHROMBIN® TGA kit is 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 CaCl₂. The kit can be used to monitor hemophiliacs during inhibitor bypassing therapy, to monitor anticoagulation therapy, to calculate INR values for patients 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. TECHNOTHROMBIN® TGA is therefore a universal assay kit for analyzing and monitoring the function of the haemostatic system.

TEST PRINCIPLE

TECHNOTHROMBIN® 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 TECHNOTHROMBIN® TGA reagent kit for 3x16 determinations contains:

mL	reagent	description
3 x 1.5	TGA substrate (SUB)	Fluorogenic substrate 1 mM Z-G-G-R-AMC, 15 mM CaCl ₂
1 x 3	TGA buffer (BUF)	Hepes-NaCl-buffer containing 0.5 % bovine serum albumin
1 x 0.5	TGA thrombin calibrator	~1.000 nM thrombin in buffer with BSA
1 x 0.5	TGA reagent C (RC) Low	RC Low conc. of phospholipid micelles containing rhTF in Tris-Hepes-NaCl buffer
1 x 0.5	TGA reagent C (RC) High	RC High conc. of phospholipid micelles containing rhTF in Tris-Hepes-NaCl buffer
1 x 1.5	TGA reagent D (RD)	RD conc. of phospholipid micelles in Tris-Hepes-NaCl buffer
1 x 1	TGA control high (CH)	Human plasma with increased thrombin generation, lyophilized.
1 x 1	TGA control low (CL)	Human plasma with decreased thrombin generation, lyophilized.

Each reagent is available on a modular basis.

The TECHNOTHROMBIN® TGA B contains:

mL	reagent	description
0.5	TGA reagent B (RB)	RB conc. of phospholipid micelles containing rhTF in Tris-Hepes-NaCl buffer

The TECHNOTHROMBIN® TGA CAL Set contains:

mL	reagent	description
1 x 3	TGA buffer (BUF)	Hepes-NaCl-buffer containing 0.5 % bovine serum albumin
1 x 0.5	TGA thrombin calibrator	~1.000 nM thrombin in buffer with BSA

MATERIAL REQUIRED (not supplied with the kit)

- Pipettes - Distilled water
- Microtiter plates suitable for fluorescence measurement (we recommend black NUNC Maxisorp REF 475515)
- Fluorimeter, fluorescence reader (96-well format), ~360 nm/~460 nm (excitation/emission) with suitable software to monitor changes of fluorescence over time. Applications for several readers are available as download from www.technoclone.com.

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_sAg, HIV 1/2 antibodies and HCV antibodies. However, general precautions should be taken by handling all human source materials as potentially infectious.
- All blood and plasma samples and products have to be handled as potentially infectious and with appropriate care and in compliance with the respective biosafety regulations and must be disposed in the same way as hospital waste.

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)	+2...8°C	-20°C
TGA substrate (SUB)	1 week	1 month	6 months
TGA buffer (BUF)	8 hours	1 week	1 month
TGA thrombin calibrator (CAL)	8 hours	1 week	6 months
TGA reagent B (RB), C Low (RCL), High (RCH), D (RD)	8 hours	1 week	6 months
TGA control high (CH)	4 hours	8 hours	1 month
TGA control low (CL)	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 TECHNOTHROMBIN® TGA assay citrated plasma, we recommend CTAD tubes, (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 exactly 20 minutes of reconstitution time and thorough mixing (Vortex), reagents are ready to use.

For standardization tests a reconstitution time of 30 minutes is recommended for controls.

READER SETTING

Please use the corresponding **reader application** (provided under www.technoclone.com).

Temperature during measurement: **37°C**

Fluorometer **wavelength**: ~360 nm / ~460 nm [excitation/emission]

Attention !

A pre-reading of the empty plate is suggested, to avoid any inaccuracies during the reading of your samples, which can occur due to inhomogeneous and defective plates.

READING TIMES

1.) Thrombin calibration curve: **10 min** in **30 sec** measurement intervals

The thrombin calibration curve has to be done separately from sample measurement.

2.) Samples: depending on the sample material **60 min** (for FVIII inhibitor therapy **90 - 120 min**) in **1 min** measurement intervals.

PERFORMANCE OF THE TEST

Samples and dissolved reagents should reach room temperature before use.

1.) Thrombin calibration curve

The thrombin calibration curve has to be done separately from sample measurement. Concentration of the thrombin calibrator (CAL) is lot dependent, consult the label on the vial.

The thrombin calibrator is diluted with TGA buffer as indicated in the table below:

1st dilution (1:2): (STD 1)	+ 200 µL Thrombin Calibrator (CAL) 200 µL TGA buffer (BUF)
2nd dilution (1:4): (STD 2)	+ 100 µL 1 st dilution 100 µL TGA buffer (BUF)
3rd dilution (1:20): (STD 3)	+ 20 µL Thrombin Calibrator (CAL) 380 µL TGA buffer (BUF)
4th dilution (1:200): (STD 4)	+ 20 µL 3 rd dilution 180 µL TGA buffer (BUF)

All calibrator dilutions have to be **measured in duplicate**.

Add reagents in the following sequence:

40 µL	calibrator dilution (STD 1 - STD 4)
50 µL	TGA substrate (SUB)
measure for 10 min in 30 sec intervals at 37°C	

Start reading of the plate/strip immediately after pipetting the substrate.

ONLY ONE CALIBRATION CURVE HAS TO BE DONE FOR EACH LOT !

2.) Sample measurement

The reagents have to be added in the following sequence:

Reagent	Measurement with:			
	TGA RB	TGA RC Low	TGA RC High	TGA RD *
sample	40 µL	40 µL	40 µL	20 µL
RB	10 µL	-	-	-
RCL	-	10 µL	-	-
RCH	-	-	10 µL	-
TGA RD	-	-	-	30 µL
TGA SUB	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL

measure for **60 min** (for FVIII inhibitor therapy **90 - 120 min**)
in 1 minute measurement intervals at **37°C**

Start reading of the plate **immediately** after pipetting the substrate.

A reagent substrate mixture can be prepared in advance.

Preparation of the mixture:

The mixture of reagent and substrate should be done in a **1+5 proportion** for RC Low and RC high and in a **3+5 proportion** for RD.

The mixture can be aliquoted and frozen at -20°C.

When reagent/substrate mixture is used the reagents have to be added to the plate in the following sequence:

Reagent	Measurement with reagent/substrate mixture:			
	RB	RC Low	RC High	TGA RD*
sample	40 µL	40 µL	40 µL	20 µL
reagent/substrate mixture	60 µL	60 µL	60 µL	80 µL

measure for **60 min** (for FVIII inhibitor therapy **90 - 120 min**)
in 1 minute measurement intervals at **37°C**

Start reading of the plate **immediately** after pipetting the reagent/substrate mixture.

Attention ! We recommend to measure duplicates for each samples.

Attention ! The lamp of the Biotek Readers is losing intensity the longer the machine is switched on. We recommend to run only 2 consecutive runs and to switch off the reader for ~ 3 hours before you start the next run.

* **ATTENTION:** different pipetting scheme for Reagent D

ANALYSIS OF RESULTS

Evaluation is done automatically with the TECHNOTHROMBIN® TGA evaluation software (Software for several readers are available as download from www.technoclone.com). The software includes calibration curve and sample evaluation.

THROMBIN CALIBRATION CURVE

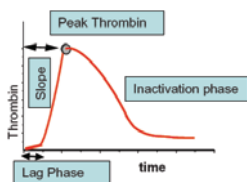
Using the provided evaluation software, RFU data (relative fluorescence units) measured by the fluorimeter for the different thrombin concentrations are converted into a thrombin calibration curve. This thrombin calibration curve is then used by the provided software to calculate nM thrombin present in the sample at a given time.

STANDARDIZATION

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

ANALYSIS OF SAMPLES

The provided evaluation software (www.technoclone.com) 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. Upon initiation of coagulation in the samples by addition of CaCl₂ and the phospholipid/tissue factor mixture, generation of thrombin is initiated after a lag period; thereafter thrombin generation per minute increases, reaching a maximum of thrombin generated and decreases thereafter. The pattern seen resembles the figure provided below:



The following parameters can be used as readout in our software:

- Lag phase** from the time point when the TGA reagent including CaCl₂ is added until the first burst in thrombin formation
- Slope:** Steepest rate of thrombin formation per minute.

Calculated by the software as velocity index

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

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 (RC Low, RC High or RD) 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 patients with bleeding disorders.

We recommend the following applications:

Reagent	Purpose
TGA RB, RC Low	- measurement of thrombophilia tendency (preferentially in standard PPP plasma) - measurement of bleeding tendency - to monitor inhibitor bypass therapy with FEIBA and rFVIIa in hemophiliacs with Factor VIII inhibitors - hF VII, hF Xa, hF XIa - to monitor the thrombogenicity of microparticles
TGA RC High	- monitoring oral anticoagulation therapy .
TGA RD	- monitoring heparin anticoagulation, direct thrombin and Xa inhibitor therapy . - hF XIIa, plasma callicrein, callicrein1 (Tissue Factor)

NORMAL RANGE

The expected values for PPP and PRP plasmas are:

Sample	Reagent	Peak Thrombin nM	SD (Standard deviation)
PPP (Platelet Poor Plasma)	RC Low	289.5	151.9
	RC High	597.0	225.7
	RD	405.6	43.6
PRP (Platelet Rich Plasma)	RC Low	602.2	106.9
	RC High	733.4	102.8
	RD	363.6	32.9

REFERENCE RANGE

It is important to note that the controls 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.
- Inaccurate results can occur due to inhomogeneous and defective plate, inaccurate pipetting and delayed readings after pipetting.
- Attention! The lamp of the Biotek Readers is losing intensity the longer the machine is switched on. We recommend to run only 2 consecutive runs and to switch off the reader for ~ 3 hours before you start the next run.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Performance data are given below. Results obtained in individual laboratories may differ.

PRECISION

Reproducibility was determined with different samples (in series and day to day). The following results were obtained:

Sample	Intra-assay		Inter-assay	
	Sample 1	Sample 2	Sample 1	Sample 2
n	4	4	4	4
MV (nM Peak Thrombin)	35,0	225,8	27,8	179,8
SD (%)	2,0	8,3	1,7	13,9
CV (%)	5,6	3,7	6,2	7,7

COMPARISON OF METHODS OR CORRELATION

Following correlation (%) was obtained in comparing Peak thrombin using Technothrombin TGA with trigger reagent RB manual method with TGA automated method on Ceveron® alpha:

$$y = 0,6797x - 2.4708 \quad R^2 = 0.9975$$

LITERATURE

For literature please consult our website www.technoclone.com.

PRODUKTBESCHREIBUNG

ANWENDUNG

Der TECHNOTHROMBIN® TGA Kit ist ein Reagenziensatz zur Bestimmung der Thrombingenerierung im Zeitablauf in **plättchenarmem (PPP) oder plättchenreichem (PRP)** Plasma, nachdem die Gerinnungskaskade durch Phospholipidmicellen, die verschiedene Mengen an Tissue Faktor und CaCl₂ 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 Thrombingenerierung während Initiation, Amplifikation und Inhibierung der Thrombinbildung.

TESTPRINZIP

Der Kit 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 Thrombingenerierung 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

Der **TECHNOTHROMBIN® TGA Kit** für 3x16 Bestimmungen enthält:

mL	Reagenz	Beschreibung
3 x 1,5	TGA Substrat (SUB)	Fluorogenes Substrat 1 mM Z-G-G-R-AMC, 15 mM CaCl ₂
1 x 3	TGA Puffer (BUF)	Hepes-NaCl-Puffer mit 0,5 % BSA
1 x 0,5	TGA Thrombinkalibrator	~1.000 nM Thrombin in Puffer in BSA
1 x 0,5	TGA Reagenz C (RCL) Low	RCL niedrig konzentrierte Phospholipid-Micellen rhTF in Tris-Hepes-NaCl Puffer
1 x 0,5	TGA Reagenz C (RCH) High	RCH hoch konzentrierte Phospholipid-Micellen rhTF in Tris-Hepes-NaCl Puffer
1 x 1,5	TGA Reagenz D (RD)	RD konzentrierte Phospholipid-Micellen in Tris-Hepes-NaCl Puffer
1 x 1	TGA Kontrolle high (CH)	Humanes Plasma mit erhöhter Thrombingenerierung, Iyo.
1 x 1	TGA Kontrolle low (CL)	Humanes Plasma mit verminderter Thrombingenerierung, Iyo.

Alle Reagenzien sind auch modular erhältlich.

Das **TECHNOTHROMBIN® TGA RB** enthält:

mL	reagent	description
0,5	TGA reagent B (RB)	RB niedrig konzentrierte Phospholipid-Micellen rhTF in Tris-Hepes-NaCl Puffer

Das **TECHNOTHROMBIN® TGA CAL Set** enthält:

mL	Reagenz	Beschreibung
1 x 3	TGA Puffer (BUF)	Hepes-NaCl-Puffer mit 0,5 % BSA
1 x 0,5	TGA Thrombinkalibrator	~1.000 nM Thrombin in Puffer in BSA

BENÖTIGTE MATERIALIEN (nicht im Testkit enthalten)

- Pipetten - Destilliertes Wasser
- Geeignete Mikrotiterplatten für die Fluoreszenzmessung (wir empfehlen schwarze NUNC Maxisorp REF 475515)
- Fluorometer, Fluoreszenzreader (96-Näpfe), ~360 nm / ~460 nm (Extinktion/Emission) mit geeigneter Software zur Berechnung der Fluoreszenzänderung. Applikationen für verschiedenen Reader können von Webseite www.technoclone.com heruntergeladen werden.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur für Forschungszwecke
- Jede Reagenziencharge der Kontrollen und jedes hierzu verwendete Einzelplasma ist Hb_sAg, 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.
- Alle humanen Blut- bzw. Plasmaprodukte und Patientenproben müssen als potentiell infektiös angesehen werden. Sie sind mit der notwendigen Sorgfalt und entsprechend den Sicherheitsvorschriften zu behandeln und wie Krankenhausmüll zu entsorgen.

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)	2...8°C	-20°C
TGA Substrat (SUB)	1 Woche	1 Monat	6 Monate
TGA Puffer (BUF)	8 Stunden	1 Woche	1 Monat
TGA Thrombinkalibrator(CAL)	8 Stunden	1 Woche	6 Monate
TGA reagent B (RB), C Low (RCL), High (RCH), D (RD)	8 Stunden	1 Woche	6 Monate
TGA Kontrolle high (CH)	4 Stunden	8 Stunden	1 Monat

TGA Kontrolle low (CL)	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 Probenmaterials: * Raumtemperatur

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

Für den TECHNOTHROMBIN® TGA Test kann entsprechend der spezifischen Anwendung Citratplasma, vorzugsweise in CTAD Röhrchen, (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 20 min Rekonstitutionszeit und sorgfältigem Mischen (Vortex) können die Reagenzien verwendet werden.

Für Standardisierungs-Untersuchungen empfiehlt sich eine Rekonstitutionszeit von 30 Minuten.

READER EINSTELLUNGEN

Bitte verwenden Sie die entsprechende **Reader Applikationen**, die unter www.technoclone.com herunter geladen werden können.

Messtemperatur: **37°C**

Fluorometer **Wellenlängen:** ~360 nm / ~460 nm [Extinktion/Emission]

Bitte beachten Sie!

Es wird empfohlen die Mikrotiterplatten vorab leer zu lesen („pre reading“), um Ungenauigkeiten, die auf eine Inhomogenität oder eine defekte Platte zurückzuführen sind, zu vermeiden.

MESSZEITEN

1.) Thrombinkalibrationskurve: 10 min in 30 sec Messintervallen

Die Thrombinkalibrationskurve wird separat von der Probenmessung erstellt.

2.) Proben: je nach Probenmaterial **60 min in 1 min Messintervallen** (für FVIII Inhibitor Therapie **90 - 120 min**)

TESTVERFAHREN

Die Proben und gelösten Reagenzien sollen vor Gebrauch Raumtemperatur erreicht haben.

1) Thrombinkalibrationskurve

Die Thrombinkalibrationskurve wird separat von der Probenmessung erstellt. Verdünnung des Thrombinkalibrators mit dem TGA Puffer nach unten stehender Vorschrift. Die Konzentration des Thrombinkalibrators (CAL) ist Lotspezifisch, entnehmen Sie diese bitte der Etikette des Kalibrators.

Der Thrombinkalibrator wird mit dem TGA Puffer wie folgt verdünnt:

1^{ste} Verdünnung (1:2): (STD 1)	+ 200 µL Thrombinkalibrator (CAL) 200 µL TGA Puffer (BUF)
2^{te} Verdünnung (1:4): (STD 2)	+ 100 µL 1 ^{ste} Verdünnung 100 µL TGA Puffer (BUF)
3^{te} Verdünnung (1:20): (STD 3)	+ 20 µL Thrombinkalibrator (CAL) 380 µL TGA Puffer (BUF)
4^{te} Verdünnung (1:200): (STD 4)	+ 20 µL 3 ^{te} Verdünnung 180 µL TGA Puffer (BUF)

Alle Verdünnungen des Kalibrators müssen **als Doppelwerte bestimmt werden**.

Pipettierschema für Thrombinkalibrationskurve:

40 µL	Kalibratorverdünnung (STD 1- STD 4)
50 µL	TGA Substrat (SUB)
Messung über 10 min in 30 sec Messintervallen bei 37°C	

Starten Sie die Messung sofort nach dem Pipettieren des Substrates.

PRO LOT MUSS NUR EINE KALIBRATIONSKURVE ERSTELLT WERDEN!

2.) Probenmessung

Die Reagenzien werden in folgender Reihenfolge pipettiert:

Reagenz	Messung mit:			
	TGA RB	TGA RC Low	TGA RC High	TGA RD *
sample	40 µL	40 µL	40 µL	20 µL
RB	10 µL	-	-	-
RCL	-	10 µL	-	-
RCH	-	-	10 µL	-
TGA RD	-	-	-	30 µL
TGA SUB	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL

Messung über 60 min (bei FVIII Inhibitor Therapie 90-120 min)
in 1 min Messintervallen bei 37°C

Starten Sie die Messung **sofort** nach dem Pipettieren des Substrates.

Eine Reagenz/Substrat Mischung kann vorab hergestellt werden.

Herstellung der Mischung:

Reagenz und Substrat sollen im **Verhältnis 1+5** für RC Low und RC High und in einem **3+5 Verhältnis** für RD gemischt werden.

Die Mischung kann aliquotiert und bei -20°C eingefroren werden.

Wenn die Reagenz/Substrat Mischung verwendet wird, soll folgende Pipettierreihenfolge eingehalten werden:

Reagenz	Messung mit Reagenz/Substrat Mischung:			
	RB	RC Low	RC High	TGA RD *
Probe	40 µL	40 µL	40 µL	20 µL
Reagenz/Substrat Mischung	60 µL	60 µL	60 µL	80 µL

Messung über 60 min (bei FVIII Inhibitor Therapie 90-120 min)
in 1 min Messintervallen bei 37°C

Starten Sie die Messung der Platte **sofort** nach dem Pipettieren der Reagenz/Substrat Mischung.

Bitte beachten Sie ! Es wird empfohlen Doppelwerte zu messen.

ACHTUNG ! Die Biotek Reader Lampen verlieren an Intensität desto länger das Gerät eingeschaltet ist, wir empfehlen daher nur 2 Testläufe hintereinander durchzuführen und das Gerät danach auszuschalten. Lassen Sie das Gerät für zirka 3 Std. ruhen, danach können Sie Ihre Messungen wieder fortsetzen.

* **ACHTUNG:** Beachten Sie die unterschiedlichen Pipettierolumina bei Reagenz D

ANALYSENERGEBNISSE

Die Auswertung erfolgt automatisch durch die TECHNO thrombin® TGA Auswertesoftware (Protokolle sowie Auswertungsvorlagen für verschiedene Reader können auf der Webseite www.technoclone.com runtergeladen werden. Die Software beinhaltet: Thrombinkalibrationskurve und Auswertung der Ergebnisse.

THROMBINKALIBRATIONSKURVE

Mit Hilfe der zur Verfügung gestellten Software (unter www.technoclone.com), wird aus den für verschiedene Thrombin-Konzentrationen ermittelten RFU Werten (relative fluorescent units) eine Thrombinkalibrationskurve errechnet. Diese wird dann unter Anwendung derselben Software dazu verwendet, die Thrombin Konzentration (nM) der Probe zu einem gegebenen Zeitpunkt zu berechnen.

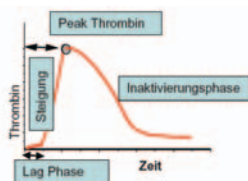
STANDARDISIERUNG

Der Thrombinkalibrator wurde gegen die aktuelle WHO Referenz-präparation kalibriert.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die zur Verfügung gestellte Software (unter www.technoclone.com) 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.

Nach Aktivierung der Gerinnung in der Probe durch Zugabe von CaCl₂ und der Phospholipid/Tissue Faktor Mischung wird die Bildung von Thrombin nach einer Lag Phase initiiert; danach nimmt die Thrombingenerierung pro min. stetig zu, erreicht ein Maximum und nimmt danach wieder ab. Es ergibt sich ein der folgenden Abbildung analoger Verlauf:



Folgende Parameter können für die Bewertung der Ergebnisse herangezogen werden.

1. Die **Latenz (Lag) Phase** vom Zeitpunkt der Reagenz-Zugabe bis zur ersten 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 plättchenarmen 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 Antikoagulantientherapie oder bei Blutungsübel erniedrigt.

Wir empfehlen folgende Reagenzien zur Bestimmung von:

Reagenz	Zweck
TGA RB, RC Low	- Messung einer Thromboseeignung (bevorzugt plättchenarmes Plasma PPP) - Messung einer Blutungsneigung - für das Monitoring einer FVIII Inhibitor Bypass Therapie mit FEIBA und/oder rFVIIa - hF VII, hF Xa, hF XIa - Monitoring der Thrombogenität der Mikropartikeln
TGA RC High	- Monitoring einer oralen Antikoagulantientherapie
TGA RD	- Monitoring einer Heparin, direkter Thrombin und Xa Inhibitor Therapy - hF XIIa, Kallikrein Plasma, Kallikrein1 (Tissue Factor)

NORMALBEREICH

Für PPP und PRP werden folgende Werte erwartet:

Probe	Reagenz	Peak Thrombin nM	SD
PPP (Plättchenarmes Plasma)	RC Low	289,5	151,9
	RC High	597,0	225,7
	RD	405,6	43,6
PRP (Plättchenreiches Plasma)	RC Low	602,2	106,9
	RC High	733,4	102,8
	RD	363,6	32,9

REFERENZBEREICH

Es ist zu beachten, dass die Kontrollen 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 inhomogene oder defekte Platten, unpräzises Pipettieren sowie einem verzögertem Beginn der Messung nach dem Pipettieren des Substrates haben.
- Die Biotek Reader Lampen verlieren an Intensität desto länger das Gerät eingeschaltet ist, wir empfehlen daher nur 2 Testläufe hintereinander durchzuführen und das Gerät danach auszuschalten. Lassen Sie das Gerät für zirka 3 Std. ruhen, danach können Sie Ihre Messungen wieder fortsetzen.

SPEZIFISCHE LEISTUNGSDATEN

Nachstehend werden repräsentative Leistungsdaten angezeigt. Die Ergebnisse des einzelnen Labors können davon abweichen.

PRÄZISION

Die Reproduzierbarkeit wurde mit verschiedenen Probenbestimmt (in Serie und von Tag zu Tag). Die Ergebnisse sind wie folgt:

Probe	Intra-assay		Inter-assay	
	Probe 1	Probe 2	Probe 1	Probe 2
n	4	4	4	4
MV (nM Peak Thrombin)	35,0	225,8	27,8	179,8
SD (%)	2,0	8,3	1,7	13,9
CV (%)	5,6	3,7	6,2	7,7

METHODENVERGLEICH ODER KORRELATION

Folgende Korrelationen (%) erhält man im Vergleich Peak Thrombin in Verwendung von Technothrombin TGA mit Trigger Reagenz B manuelle Methode zur automatischen am Ceveron® alpha TGA.

$$y = 0,6797x - 2.4708 \quad R^2 = 0.9975$$

LITERATUR

Für Literaturhinweise besuchen Sie bitte unsere Webseite www.technoclone.com