



## **Gel Clot LAL Reagent**

**Teste único para endotoxina em ampola**

**Código: TX-18118-50**

**Kit suficiente para teste em 50 amostras.**

**Armazenamento e transporte: 2°-8°C**

Os testes individuais do reagente LAL com formação de coágulo de gel em ampola são a maneira mais econômica de testar as endotoxinas presentes em soluções e demais. Este reagente apresenta enorme robustez perante às interferências do ambiente, com uma sensibilidade padrão de 0,125 EU/mL.

### 1. Recomendações de uso:

*Gel Clot Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) é recomendado para uso in vitro da detecção de endotoxinas bacterianas (lipopolissacarídeos) dos Gram negativos através do método de formação de gel ou *Gel Clot assay*.

**OBSERVAÇÃO: Somente para uso in vitro.** A introdução no organismo humano por qualquer meio é estritamente proibida.

### 2. Informações sobre o produto

O reagente de LAL é o lisado do sangue azul de caranguejo ferradura *Tachypleus tridentatus*. Tem a mesma função que o reagente LAL de lisado de amebócito do *Limulus* para detectar a endotoxina no método do coágulo de gel.

Gel Clot LAL é o teste único em ampola. Após a adição de Água Reagente LAL para reidratar o reagente LAL em volume de 100 µL, este tubo é considerado o controle negativo. As amostras são adicionadas diretamente aos tubos da ampola e incubada a 37°C por 60 minutos, após incubação, um gel firme e intacto é formado após a inversão dos tubos em 180 graus, o que indica no teste a presença de endotoxina. Os frascos de reagente LAL de teste único não requerem tubos de teste de vidro isentos de pirogênios.

Os usuários deste teste de endotoxina não precisam de mais reagentes ou etapas, sendo que o ensaio é realizado em uma única etapa. O método é simples, conveniente, sem a necessidade de equipamentos caros. Nós fornecemos reagente de grande sensibilidade de 0,03EU / ml a 2,0EU / ml. A sensibilidade usada mais comum é 0,125EU/mL ou 0,25EU/mL.

### 3. Explicação do Teste:

O ensaio de LAL de coágulo de gel é um ensaio qualitativo para a detecção de endotoxinas bacterianas de gram-negativos. O ensaio é conduzido pela mistura de LAL com amostra de teste seguida de incubação da mistura “não perturbando” durante 60 min a 37 ° C. Se um gel se formou e permanece intacto após a inversão de 180 °, o teste é positivo, indicando que a concentração de endotoxina do espécime de teste é maior ou igual à sensibilidade rotulada da LAL. Se um gel intacto não for formado, o teste é negativo, indicando que a concentração de endotoxina do espécime de teste é menor que a sensibilidade rotulada.

### 4. Parâmetros do produto:

- Faixa de sensibilidade: 0,125EU/mL
- Um teste por tubo (50 tubos)
- Resultados positivos ou negativos (1 controle positivo) (água ultra pura 3 x 20 mL)

LGC Biotecnologia Ltda.

Rua Pasadena, 235 – Pq. Empresarial San José Cotia – SP

CEP 06715-864 – Fone-Fax: 011 46148070

[www.lgcbio.com.br](http://www.lgcbio.com.br)

- Requer volume de amostra: 0.1mL (100µL) por teste

#### 5. Princípio geral:

O ensaio gel de LAL é um ensaio qualitativo para a detecção de endotoxinas bacterianas gram-negativas. O ensaio é conduzido misturando LAL com amostra de teste, seguido de incubação da mistura “não perturbada” durante 60 minutos a 37°C. Se um gel se formou e permanece intacto após a inversão de 180°; o teste é positivo, indicando que a concentração de endotoxina da amostra de teste é maior ou igual à sensibilidade marcada da LAL. Se um gel intacto não for formado, o teste é negativo, indicando que a concentração de endotoxina do espécime de teste é menor que a sensibilidade rotulada.

#### 6. Princípio específico do ensaio:

O Lisado de Amebócito de *Limulus* (LAL) é um extrato aquoso de amebócitos circulantes do caranguejo-ferradura chinês (*Tachypleus tridentatus*). O lisado contém uma cascata de enzimas proteases de serina (pró-enzimas) que podem ser ativadas por endotoxinas bacterianas. As endotoxinas ativam as pró-enzimas para produzir enzimas ativadas (denominadas coagulase), esta última ativa ainda mais o coagulogênio na coagulina externa. coagulina auto-associa-se ao coágulo gelatinoso.

Quando a concentração de endotoxina é alta o suficiente, o gel formado é firme e permanece intacto após a inversão dos tubos de teste, o resultado do teste é classificado como positivo. Um resultado positivo indica que a concentração de endotoxina da amostra de teste é maior ou igual à sensibilidade marcada do reagente. Se um gel intacto não for fornecido, o resultado do teste é classificado como negativo, indicando que a concentração de endotoxina do espécime de teste é menor que a sensibilidade rotulada.

#### 7. Reagentes fornecidos:

##### Reagente LAL

O reagente LAL liofilizado foi produzido a partir do lisado de amebócitos de *Tachypleus tridentatus*. O lisado foi estabilizado por cations monovalentes e divalentes. A sensibilidade ( $\lambda$ ) é a concentração mínima da Endotoxina Padrão de Referência para produzir um ponto gel firme em condições padrão. A sensibilidade do lote, EU/mL é impresso nas etiquetas da embalagem.

O armazenamento entre 2 e 8°C é recomendado. Evite a exposição a temperaturas acima de 25°C ou a luz por períodos prolongados.

Reconstituir LAL com Água Reagente LAL imediatamente antes de usar. O lisado reconstituído deve ser utilizado em 10 minutos. Não congelar e descongelar o lisado.

#### 8. Reagentes necessários que podem ser não fornecidos:

1. Água Reagente LAL: Concentração de endotoxina <0,005 EU/ml.
2. Controle *Standard* de Endotoxina (CSE): a endotoxina padrão de controle é usada para confirmar a sensibilidade do LAL, validar o produto e preparar os controles de inibição. O potencial do CSE é impresso no Certificado de Análise.

#### 9. Materiais e equipamentos necessários mas não fornecidos

1. Pipetas *endotoxin-free*, 0,2 mL, 1,0 mL, 5,0 mL, ou pipetadores automáticos com ponteiros *endotoxin-free*.

2. Tubos de borosilicato para diluição das amostras, ou tubos *endotoxin-free*.
3. Vortex (diversas velocidades)
4. Termo-bloco ou banho de água sem circulação nem movimento (37°C +/- 1°C)
5. *Parafilm*
6. *Rack* para tubos

#### 10. Teste das amostras, Solução controle e preparação dos reagentes:

Toda a vidraria, plásticos e diluentes em contato com as amostras a serem testadas devem ser *endotoxin-free*. Vidraria e outros equipamentos resistentes à elevada temperatura devem ser despirogenizados em forno utilizando um processo validado para este propósito, um protocolo comumente utilizado considera 60 minutos em 250°C. Utilizar técnicas de assepsia durante todo o processo.

##### 10.1. Preparação das amostras para o teste

As amostras a serem testadas devem ser armazenadas sob condições em que as atividades bacteriológicas sejam interrompidas. O espécime poderia ser mantido a 2°C a 8°C para armazenamento temporário (menos de 24 horas). Para armazenamento por maior tempo, a amostra a ser testada deve ser mantida abaixo de -10°C.

A faixa ideal de pH para a reação LAL de endotoxina é de 6.0 a 8.0. As amostras ácidas e básicas podem ser ajustadas para a faixa de pH desejada com hidróxido de sódio 0,1N sem endotoxinas, ácido clorídrico 0.1N ou Tris buffer isento de endotoxina.

O potencial de presença de interferência deve ser registrado e eliminado seguindo a descrição na seção INIBIÇÃO DO PRODUTO.

##### 10.2. Preparação de Controles

###### **Padrões de endotoxina**

Reconstituir a endotoxina padrão de controle com Água Reagente LAL, preparar a solução de trabalho padrão endotoxina nas concentrações de 2λ, λ, 0,5λ e 0,25λ. Prepare a solução de endotoxina, e/ou separe as ampolas imediatamente antes de usar para evitar a perda de atividade devido à adsorção.

###### **Controles Positivos**

O controle positivo pode ser usado no lugar de uma série de padrões de endotoxina em determinadas circunstâncias.

O controle positivo é a solução de endotoxina na concentração de 2λ.

###### **Controles positivos do produto**

Os controles positivos do produto são os espécimes de teste contendo endotoxinas. A concentração do pico é normalmente de 2λ. Consulte a seção INIBIÇÃO DO PRODUTO.

###### **Controles Negativos**

Use água grau *LAL-free* como controle negativo

##### 10.3. Preparação do Limulus Amebocyte Lysate

Cuidado: Reconstitua a LAL imediatamente antes de usar. A menos que use ampolas.

Reconstitua LAL adicionando a quantidade rotulada de água grau LAL Reagente ao frasco.

Misture suave mas completamente. Não agitar em vortex pois o conteúdo vai espumar.

#### 11. Procedimento de teste

1. Para uma única ampola de teste, adicione 0,1 mL de Água Reagente LAL, padrões de endotoxinas ou amostras de teste em cada uma das amplas de reagente LAL reidratadas;

Para ampola multi-teste, adicione 0,1 mL de Água Reagente LAL, padrões de endotoxina ou teste de amostras em cada tubo de reação, depois adicione 0,1 mL de reagente LAL;

2. Misture suave, mas completamente. A falta de mistura adequada é uma causa de ensaios insatisfatórios. Incubar a mistura a 37°C durante 60 minutos. Evitando a vibração durante o processo de incubação.

Se número maior de amostras são testados em paralelo, os testes devem ser agrupados e iniciados em intervalos que permitam a leitura de cada um dentro do limite de tempo.

#### 12. Leitura dos Resultados:

Remova e leia os tubos de reação um por um. Inverta o tubo em um movimento suave. Um resultado positivo é indicado pela formação de um gel que não colapsa quando o tubo é invertido. Um resultado negativo é caracterizado pela ausência de coágulo sólido na inversão do tubo. Um aumento na turbidez ou na viscosidade é considerado um resultado negativo.

#### **RESULTADOS E INTERPRETAÇÃO**

Os resultados para todas as réplicas de controle negativo devem ser negativos, resultados positivos sugerem a contaminação de LAL. Água LAL Reagente ou material de vidro.

Os resultados para todas as réplicas de controle positivo devem ser positivos, resultados negativos sugerem possibilidades de perda de atividade enzimática de LAL, perda de potência de CSE e incorreção da diluição de endotoxina.

Os resultados para o controle positivo do produto devem ser positivos. Se o resultado para o controle positivo do produto é negativo, enquanto que para o controle positivo é positivo, a presença de interferências na amostra é sugerida. Veja a seção INIBIÇÃO DO PRODUTO.

#### **Determinação da diluição máxima válida**

A Diluição Válida Máxima (MVD) é a diluição máxima permitida de uma substância a ser examinada no qual o limite de endotoxina pode ser determinado. Determine o MVD usando as seguintes fórmulas:

$$MVD = CL / \lambda$$

L refere-se ao limite de endotoxina da substância a ser examinada, especificado em unidades como UE/mL, EU/mg, EU/Unidade

$$L = K / M, \text{ onde}$$

K refere-se à dose máxima permitida de endotoxina por quilograma de peso corporal por hora,

M refere-se à dose máxima permitida de substância por quilograma de peso corporal por hora.

C refere-se à concentração da substância a ser examinada, C é especificado em mg/mL se o limite de endotoxinas for especificado em massa (EU/mg) e em Unidades/ml se o limite de endotoxinas for especificado por unidade de atividade biológica (UE/Unidade).

$\lambda$  refere-se à sensibilidade LAL rotulada.

### Confirmação da sensibilidade LAL marcada ( $\lambda$ )

Execute o ensaio de coagulação do gel em 4 réplicas com LAL a ser testado e soluções padrão de endotoxina nas concentrações de  $2\lambda$ ,  $\lambda$ ,  $0,5\lambda$  e  $0,25\lambda$ .

O teste é válido somente quando os resultados para todos as replicatas de  $2\lambda$  forem positivos, resultados para todos as replicatas de  $0,25\lambda$  e controle negativo forem negativos. A

sensibilidade marcada é confirmada se a sensibilidade observada estiver entre  $0,5\lambda$  e  $2\lambda$ .

A sensibilidade observada é igual à média geométrica (G) do ponto final (e).

$$G = (e_1 \times e_2 \times \dots \times e_f)^{1/f} = 10^{-1} (\sum(10^{\log e}) / f)$$

O ponto final (e) é a menor concentração de endotoxina com resultado positivo em série, f é o número de replicatas de tubos de teste.

Um exemplo do teste de confirmação para uma amostra com sensibilidade LAL rotulada ( $\lambda$ ) de 0,25 UE/mL.

Replicates <i>f</i>	Endotoxin Concentration (EU/ml)				Negative control	Endpoint (EU/ml) <i>e</i>	Log <sub>10</sub> e	Mean of Log <sub>10</sub> e	G (EU/ml)
	$2\lambda$	$\lambda$	$0,5\lambda$	$0,25\lambda$					
	0.5	0.25	0.125	0.06					
1	+	+	-	-	-	0.25	-0.602	-0.677	0.21
2	+	+	+	-	-	0.125	-0.903		
3	+	+	-	-		0.25	-0.602		
4	+	+	-	-		0.25	-0.602		

A sensibilidade observada de 0,21 Eu/mL está entre 0,125 e 0,5 EU/mL, então a sensibilidade rotulada de 0,25 EU/mL fica assim confirmada.

### 13. Ensaio de LAL semi quantitativo

#### Ensaio Semi-Quantitativo de Gel Clot

Quantificar a concentração de endotoxinas é encontrar o ponto final em uma série de diluições de amostras. No seguinte exemplo, a amostra é diluída com água LAL Reagente, a sensibilidade da LAL é 0,25 EU/mL.

Replicates <i>f</i>	Sample dilution						Negative control	Endpoint dilution	Log <sub>10</sub> Endpoint	Mean	Log <sub>10</sub> <sup>-1</sup>
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64					
1	+	+	+	-	-	-	1:8 (0.125)	-0.903	-1.054	0.088 (1:11.3)	
2	+	+	+	+	-	-	1:16 (0.0625)	-1.204			

#### Concentração da endotoxina

= Sensibilidade de LAL x *endpoint* da diluição

= 0,25 EU/mL x 11,3

= 2,83 EU/mL

LGC Biotecnologia Ltda.

Rua Pasadena, 235 – Pq. Empresarial San José Cotia – SP

CEP 06715-864 – Fone-Fax: 011 46148070

www.lgcbio.com.br

### **Teste de Limite de Coagulação em Gel**

O teste é aplicado quando uma monografia contém um registro de endotoxina

Execute a amostra diluída junto com o controle positivo do produto, controles positivos e controles negativos, fator de diluição é MVD. Se o teste for válido (consulte a seção RESULTADOS E INTERPRETAÇÃO). Leia o resultado do espécime.

Resultados negativos para todas as replicatas de amostras indicam que a concentração de endotoxina na amostra é menor que o limite da endotoxina, o que significa que a amostra passa no teste de limite de coágulo de gel. O resultado positivo para todas as réplicas de amostras indica que a concentração de endotoxina na amostra excede o limiar da endotoxina, que é idêntica à outra, enquanto que a outra é negativa. Se uma amostra das replicatas é positiva, a amostra passará no teste apenas se todas as quatro repetições testarem negativo no teste repetido.

### **INIBIÇÃO DO PRODUTO**

A Inibição do produto é freqüentemente empregado para avaliar a existência de interferência na amostra. Prepare uma série de duas diluições de endotoxina em ambos água LAL Reagente e matriz da amostra, execute o ensaio com duas séries em paralelo, calcule o ponto final geométrico de cada série.

Se o ponto final médio geométrico da endotoxina na matriz da amostra estiver dentro da faixa de 0,5 a 5, a amostra é considerada livre de inibição do produto. Caso contrário, a existência de interferência na amostra é sugerida.

A inibição do produto geralmente é concentração dependente, e pode ser reduzido por diluição com água LAL Reagente. A diluição não deve exceder o MVD. A aplicação de LAL mais sensível permite maior diluição do espécime, o que pode melhorar a eliminação de interferências.

### **Recurso e aplicação do produto:**

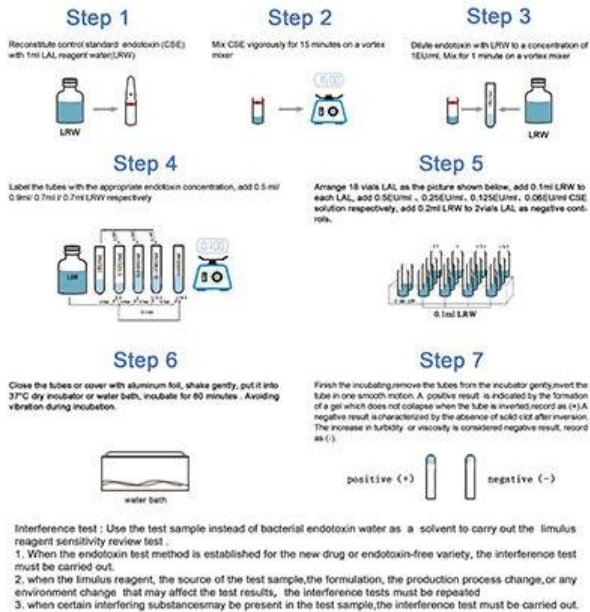
Deteção de endotoxina em um único passo, sem instrumentos caros de ensaio de endotoxina. Adequado para teste de endotoxina do produto final antes do produto ser liberado. Ensaio de endotoxina de baixo custo para fábricas farmacêuticas e pesquisadores. O ensaio pode ser realizado de forma semi-quantitativa desde que se ajustem as diluições do produto a ser testado. Assim, realizar as diluições  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$ ,  $\frac{1}{16}$ ,  $\frac{1}{32}$ ,  $\frac{1}{64}$  e testar frente a cada tubo de endotoxina. A diluição aonde a leitura for positiva deverá ser multiplicada pelo valor da sensibilidade fornecida.

Por exemplo; se a diluição  $\frac{1}{8}$  foi a última que apresentou formação de coágulo ; o valor inverso da diluição deverá ser multiplicado pela sensibilidade do lisado.

$\frac{1}{8} \cdot 0,125 = 1,00$ , resultados:  $\leq 1,0$  EU/mL. Recomenda-se sempre realizar o ensaio em duplicata.

## RESUMO DOS PROCEDIMENTOS:

Sensitivity review: When a new batch of limulus reagent or test conditions is used to effect any change that may affect the results of the test, the limulus reagent sensitivity review test should be carried out.



## Referências:

1. Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as o End-Product Endotoxin Test for Humo and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devios, U.S. Department of Ihealth and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration. December 1987.
2. Bacterial Endotoxins Test, USP 26 51 21. 2003.
3. Bang, F. B. 1956. A Bacterial Disease of Limulus Polyphemus. 1.11. Johns Hopkins Ilosp. 98:325- 351.
4. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation A the Limulus. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
5. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. The role of endotoxin o the extracellular coagulo., ofLoosooht blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265-274.
6. Levin, J., and 1.40. Hong. 1968. Clottable protein in Limulus: its localintion and kinetics of its coagulation by odotoxin. Thromb. Dir., I laemorrh. 19186-197.

LGC Biotecnologia Ltda.

Rua Pasadena, 235 – Pq. Empresarial San José Cotia – SP

CEP 06715-864 – Fone-Fax: 011 46148070

www.lgcbio.com.br