



## **Gel Clot LAL Reagent**

**Teste único para detecção de Endotoxinas em ampola**

**Código: TX-18118-50**

**Kit para teste em 50 amostras.**

**Armazenamento e transporte: entre 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 amostras líquidas. Este reagente apresenta enorme robustez perante as interferências do ambiente, com uma sensibilidade padrão de 0,125 UE/mL.

### **1. Recomendações de uso:**

*Gel Clot Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) é recomendado para uso *in vitro* da detecção de Endotoxinas bacterianas (lipopolissacarídeos) provenientes de parede de organismos 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 de coagulação ou formação de gel. A ampola após a adição de Água Reagente LAL em volume de 100 µL, é considerada como o controle negativo. As amostras por sua vez são adicionadas diretamente nas ampolas, no mesmo volume (100 µL) e

incubadas em 37°C por 60 minutos, após este tempo de 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 tubos com resultados negativos, não deverão apresentar nenhum coágulo nem gel. As ampolas contendo o reagente LAL de teste único não requerem tubos de teste de vidro adicionais, pois os ensaios são realizados diretamente na mesma ampola. 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.

### **3. Parâmetros do produto:**

- Faixa de sensibilidade: 0,125 UE/mL,
- Um teste por ampola (50 ampolas),
- 1 controle positivo
- Água reagente LAL 3 x 20 mL),

### **4. Princípio geral do ensaio:**

O Lisado de Amebócito de *Limulus* (LAL) é um extrato aquoso dos amebócitos circulantes do caranguejo-ferradura (*Tachypleus tridentatus*). O lisado contém uma cascata de enzimas serino-proteases (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

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)

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 para o kit (0,125 UE/mL). Se um gel intacto não se formar, o resultado do teste é classificado como negativo, indicando que a concentração de Endotoxina do espécime de teste é menor que a sensibilidade rotulada (0,125UE/mL).

#### **5. Reagentes fornecidos:**

##### Controle positivo-Reagente LAL liofilizado

O reagente LAL liofilizado foi produzido a partir do lisado de amebócitos de *Tachypleus tridentatus*, e estabilizado por cátions mono e divalentes. A sensibilidade do lote, em UE/mL está impresso nas etiquetas da embalagem.

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

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

#### **7. Amostras, Solução controle e preparação dos ensaios:**

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.

##### **7.1. Preparação das amostras para o teste**

As amostras a serem testadas devem ser armazenadas sob condições em que a atividade bacteriológica seja interrompida. O espécime poderia ser mantido entre 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.

As diluições das amostras a serem testadas poderão ser homogêneas com auxílio de vortex. As amostras deverão ser diluídas na seguinte ordem: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, etc.

##### **7.2. Preparação de Controles**

- **Controle Padrão Positivo de Endotoxina**

Reconstituir a Endotoxina Padrão de controle com Água Reagente LAL, na concentração de 1UE/mL. Assim, se no vial está indicado 5UE/vial, reconstitua com 5mL de água LAL reagente, pois assim terá 1UE/mL.

- **Controle Negativo**

Use água LAL-reagente como controle negativo

### **7.3. Preparação do *Limulus Amebocyte Lysate***

Com o uso de ampolas, misture suave e gentilmente as amostras. Não agitar em vórtex, pois o conteúdo vai espumar e pode gerar resultados falso-negativos.

### **8. Procedimento de teste**

1. Para uma ampola de teste, adicionar 0,1 mL (100 µL) de sua amostra,
2. Para uma ampola de teste negativo, adicionar Água Reagente LAL, 0,1 mL (100µL),
3. Para uma ampola de teste positivo, adicionar padrão de Endotoxina 0,1 mL (100µL).

Misturar suave, mas, completamente cada ampola com as amostras. A falta de mistura adequada é uma causa de ensaios insatisfatórios. Incubar a mistura a 37°C durante 60 minutos, em Banho Maria estável, Banho seco ou Estufa bacteriológica. Evitando completa e totalmente a vibração durante o processo de incubação.

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

### **9. Leitura dos Resultados:**

Remover e ler os tubos de reação um a um. Inverter o tubo em um movimento suave. Um resultado positivo é indicado pela formação de um gel compacto 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.

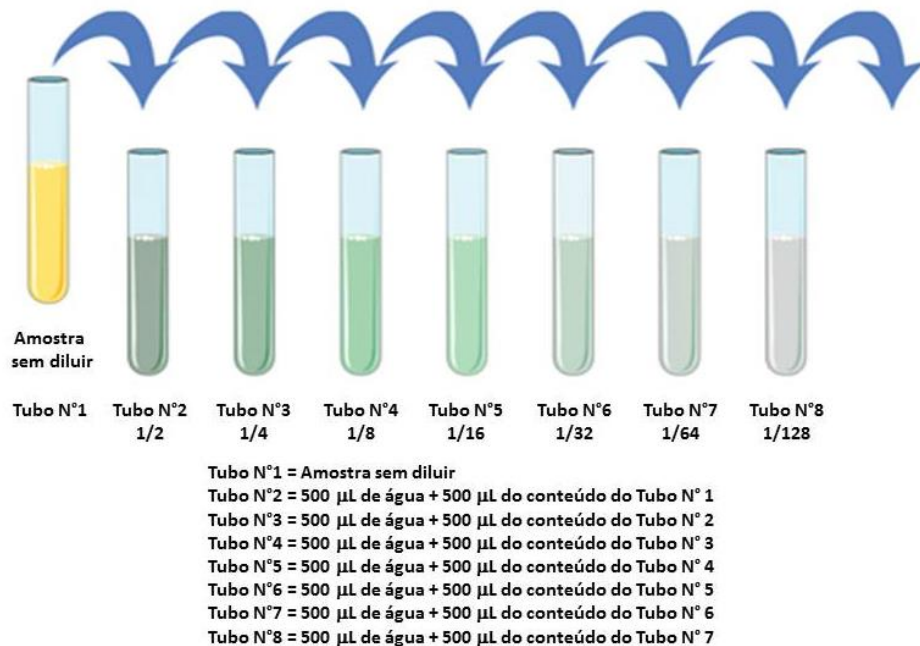
Os resultados para todas as réplicas de controle negativo devem ser negativos, resultados positivos sugerem a contaminação de LAL; Água LAL Reagente ou material de vidro.

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 lisado e incorreção da diluição de Endotoxina. Se o resultado para o controle positivo do produto é negativo, enquanto que para o controle negativo é positivo, a presença de interferências na amostra é sugerida.

Veja a seção INIBIÇÃO DO PRODUTO.

### **10. 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 0,125 UE/mL.



Concentração da Endotoxina  
= Sensibilidade de LAL x *endpoint* da diluição (inverso)  
= 0,125 EU/mL x 8  
= 1UE/mL

### Inibição do Produto

A inibição do produto é frequentemente empregada para avaliar a existência de interferência na amostra. Prepare uma série de duas diluições de Endotoxina em ambos; água LAL Reagente e amostra, executar o ensaio com duas séries em paralelo, calcular 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 aplicação de LAL mais sensível permite maior diluição do espécime, o que pode melhorar a eliminação de interferências.

### Aplicação do produto:

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

#### **VISUALIZAÇÃO DOS TUBOS COM RESULTADO POSITIVO:**



#### **Referências:**

1. Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as of End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices, U.S. Department of Health 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 Hosp. 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 on the extracellular coagulation, of Limulus blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265-274.
6. Levin, J., and 1.40. Hong. 1968. Clottable protein in Limulus: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Dir., I laemorrh. 19186-197.