

LAL – KIT DE DETECÇÃO DE ENDOTOXINAS**TX-18250-50 - Sensibilidade 0,250 UE/mL - 50 testes****Ficha de Instruções de Uso****1. Uso pretendido**

Os testes com o LAL - Kit de detecção de endotoxinas, 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 sensibilidade de 0,250 UE/mL.

Os pirógenos mais potentes e mais amplamente conhecidos são as Endotoxinas ou Lipopolissacarídeos (LPS), que são componentes das paredes celulares de bactérias Gram-negativas. O LAL - KIT DE DETECÇÃO DE ENDOTOXINAS utiliza um método sensível para a detecção destas endotoxinas bacterianas.

Este produto é de uso EXCLUSIVO PARA ENSAIOS *IN VITRO*.

2. Composição do Kit (suficiente para 50 testes)

- 50 ampolas- LAL Liofilizado - acondicionadas em 5 cartelas de 10 ampolas cada
- 60 mL de Água ultrapura reagente LAL
- 01 frasco de vidro - Controle Padrão Positivo de Endotoxina – Cepa bacteriana *E. coli* O111:B4 (20 UE/vial)

3. 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 que podem ser ativadas por endotoxinas bacterianas.

As endotoxinas ativam as pró-enzimas para produzir enzimas ativas (denominadas coagulases), 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 para o kit (0,250 UE/mL). Se um gel intacto não se forma, o resultado do teste é classificado como negativo, indicando que a concentração de Endotoxina do espécime de teste é menor que a sensibilidade rotulada (0,250 UE/mL).

4. Modo de Uso

Este é um teste único onde as amostras são adicionadas diretamente às ampolas prontas-para-uso. Os usuários deste teste de endotoxina não precisam de outros reagentes, pois o ensaio é realizado em uma única etapa. O método é simples e não necessita de outros equipamentos.

4.1 Parâmetros do produto:

- Sensibilidade: 0,250 UE/mL
- Volume de amostra: 0,1 mL (100µL) por teste

4.2 Reagentes fornecidos:

- Ampolas com superfície destacável para cada teste individual.
- Controle Padrão Positivo de Endotoxina – Cepa bacteriana *E. coli* O111:B4 (20 UE/vial).
- Água ultra pura reagente LAL usada como controle negativo e para diluição do CP.

4.3 Materiais e equipamentos necessários, não fornecidos:

- Pipetas *endotoxin-free*, 0,2 mL, 1,0 mL, 5,0 mL, ou pipetadores automáticos com ponteiras *endotoxin-free*
- Termo-bloco ou banho de água sem circulação nem movimento, ou estufa bacteriológica (37°C +/- 1°C),
- *Parafilm* ou papel alumínio
- Suporte para ampolas.

5. Amostras, controles e preparação dos ensaios:

Toda a vidraria, plásticos e diluentes em contato com as amostras devem ser *endotoxin-free*. Vidraria e outros equipamentos resistentes à elevada temperatura devem ser despirogenizados em forno, utilizando processos validados para este propósito. Considerar o protocolo que utiliza a fornagem dos materiais durante 60 minutos à 250°C. Utilizar técnicas de assepsia durante todo o processo.

5.1 Preparação das amostras para o teste:

A partir deste momento utilizar luvas descartáveis sem talco. As amostras a serem testadas devem ser armazenadas em ambiente isento de contaminantes. O espécime poderá ser mantido entre 2°C e 8°C para armazenamento temporário (menos de 24 horas). Para armazenamento por maior tempo, a amostra deve ser mantida abaixo de -10°C.

5.2 Preparação de Controles

Controle Padrão Positivo de Endotoxina

1. Reconstituir o Controle Padrão Positivo de Endotoxina com 10mL de água reagente LAL (concentração final de 2UE/mL).
2. Adicionar os 10mL de água ultra pura reagente LAL diretamente no frasco do CP e,
3. Agitar de forma homogênea e firme, cuidando para não deslocar a tampa e não abrir a tampa do frasco. Agitar até completa dissolução.

Controle Negativo de endotoxina

Usar água ultra pura reagente LAL como controle negativo de endotoxina.

6. Procedimento de cada teste

1. Quebrar a ampola com o ponto azul direcionado para o rosto,
2. Para cada ampola de teste, adicionar 0,1 mL (100 µL) de amostra,
3. Para a ampola correspondente ao controle negativo, adicionar 0,1 mL (100µL) de água reagente LAL,
4. Para a ampola correspondente ao controle positivo, adicionar 0,1 mL (100µL) de CP de Endotoxina,
5. Misturar suavemente com movimentos circulares, cada ampola com as amostras.

ATENÇÃO: A falta de mistura adequada é uma causa de ensaios insatisfatórios.

Colocar papel de alumínio ou *parafilm* na parte superior de cada ampola. Incubar a mistura a 37°C durante 60 minutos, em Banho Maria estável ou em Banho seco ou em Estufa bacteriológica.

Evitar completa e totalmente vibrações durante o processo de incubação.

Obs.: Se número maior de amostras for testada em paralelo, os testes devem ser agrupados e iniciados em intervalos que permitam a visualização do resultado de cada amostra dentro do limite de tempo (60 minutos).

7. Visualização e interpretação dos Resultados

Remover as ampolas da incubação. Inverter cada ampola a 180° em um movimento suave. Interpretar os resultados de acordo com as tabelas a seguir:

Tabela 1. Visualização e interpretação dos resultados obtidos

| Aspecto do material dentro da ampola | Resultados |
|--|------------|
| Formação de coágulo firme | Positivo |
| Ausência de coágulo firme | Negativo |
| Formação de viscosidade/turbidez/grumos isolados | Negativo |

Tabela 2. Critérios para validação do teste

| Controles | Aspecto do material dentro da ampola | Resultados |
|-------------------|--------------------------------------|------------|
| Controle positivo | Formação de coágulo firme | Positivo |
| Controle negativo | Ausência de coágulo firme | Negativo |

Obs. Caso os controles apresentem resultados divergentes da tabela acima, os ensaios deverão ser repetidos.

8. Fontes potenciais de variabilidade

Pipetagem, calibração de pipetas e equipamentos, qualidade das amostras.

9. Armazenamento e transporte

- Armazenar entre 2 a 8°C quando fechado.
- Após aberto armazenar entre 2 a 8°C, mesmo após reconstituição.
- Temperatura de transporte de 22 a 45°C. Após o recebimento o kit deverá ser armazenado entre 2 a 8°C

Atenção: Os componentes do Kit não devem ser congelados sob nenhuma circunstância.

10. Validade

O **KIT DE DETECÇÃO DE ENDOTOXINAS LAL** tem validade de 24 meses quando mantido fechado/aberto, quando armazenado na temperatura indicada (2 a 8°C).

11. Informação de Segurança

- Sempre que estiver trabalhando com soluções químicas e amostras biológicas, EPIs são necessários conforme normas de segurança regulamentadas.
- Depois de receber o produto verificar se as embalagens estão danificadas ou se há vazamento.
- Produto de uso apenas laboratorial e deverá ser armazenado em condições próprias para uso em laboratório.
- Contaminações causadas pelos resíduos são raríssimas, mas não podem ser completamente descartadas. Portanto, os resíduos devem ser considerados como material infeccioso e devem ser manuseados de acordo com as normas de segurança regulamentadas.
- Caso sejam necessárias mais informações a respeito do produto, favor entrar em contato com a NOVA BIOTECNOLOGIA.

12. Garantia da Qualidade

A **NOVA BIOTECNOLOGIA** fornece garantia do produto **KIT DE DETECÇÃO DE ENDOTOXINAS LAL** por ela fornecido contra defeitos de produção pelo período de validade do produto, salvo especificações em contrário a constar da proposta.

- A garantia abrange defeitos de produção.
Exceções na garantia:
- Todos os produtos com defeitos oriundos de mau uso, imperícia, conservação ou armazenagem inadequada.
- Quando não for utilizado de acordo com sua finalidade de aplicação.

13. Informações do Fabricante

NOVA BIOTECNOLOGIA LTDA

R. PASADENA, 235 - PARQUE INDUSTRIAL SAN JOSE, CEP: 06.715-864 - COTIA/SP - BRASIL

CNPJ: 24.096.423/0001-15

RESPONSÁVEL TÉCNICO

Dra. ELIZABETH CORTEZ HERRERA - CRBM 20951

14. Atendimento ao Consumidor

Tel: +55 (11) 4243-2356

e-mail: www.novabiotecnologia.com.br; assessoria@novabiotecnologia.com.br;
sac@novabiotecnologia.com.br

15. Registro ANVISA

Registro 81867919001