

LAL – KIT DE DETECÇÃO DE ENDOTOXINAS**TX-18118-50 - Sensibilidade 0,125 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 0,125 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 (0,125 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 (0,125 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: 0,125 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 ponteiros *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 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

- 6.1 Quebrar a ampola com o ponto azul direcionado para o rosto,
- 6.2 Para cada ampola de teste, adicionar 0,1 mL (100 µL) de amostra,
- 6.3 Para a ampola correspondente ao controle negativo, adicionar 0,1 mL (100µL) de água reagente LAL,
- 6.4 Para a ampola correspondente ao controle positivo, adicionar 0,1 mL (100µL) de CP de Endotoxina,

6.5 Misturar suavemente com movimentos circulares, cada ampola com as amostras.

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

6.6 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 (termobloco) 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:

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 1. Visualização e interpretação dos resultados obtidos

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

Tabela 2. Critérios para validação do teste

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 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 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