



Lisado de amebócitos de límulo (LAL) Kinetic-QCL™

Índice

Seção	Nº da página	
1	Uso pretendido	2
1	Advertência	2
1	Explicação do ensaio	3
2	Princípio	4
2	Reagentes fornecidos e condições de armazenamento	5
3	Materiais e equipamentos não incluídos	6
4	Coleta e preparação da amostra	8
4	Tipos de ensaio Kinetic-QCL™	9
5	Preparação dos reagentes	11
6	Procedimento de ensaio	14

Seção	Nº da página	
7	Características de desempenho	16
7	Cálculo das concentrações de endotoxina	17
8	POWERCURVE™	20
9	Inibição da reação pelo produto ensaiado	22
9	Limitações e indicações	25
9	Amostras coloridas	25
10	Curva-padrão arquivada	26
10	Correlação com outros métodos	27
10	Observação para clientes fora dos EUA	27
11	Referências	28

Importante: Leia todo este prospecto antes de realizar o ensaio

Uso pretendido

Este produto destina-se ao uso como ensaio de endotoxina *in vitro* para fármacos parenterais, produtos biológicos e dispositivos médicos para uso em humanos ou animais. Este produto não se destina a detectar endotoxinas em amostras clínicas nem a ajudar no diagnóstico de doenças humanas. O ensaio utiliza um preparado de lisado de amebócitos de límulo (LAL), que é usado para detectar endotoxinas por método fotométrico empregando uma leitora de microplacas com incubação e software apropriado.

A Farmacopeia descreve os procedimentos considerados necessários para:

1. Definir limites de endotoxinas para produtos farmacêuticos e dispositivos médicos
2. Validar o uso de LAL como ensaio de endotoxina para produtos acabados
3. Desenvolver um protocolo de ensaio de rotina⁸

Os procedimentos aqui descritos baseiam-se nas diretrizes da Farmacopeia.

Advertência

Uso exclusivo para diagnóstico *in vitro*. O ensaio Kinetic-QCL™ não se destina a detectar endotoxemia em seres humanos. O ensaio LAL pode ser substituído pelo ensaio de pirogênio em coelhos descrito na USP, quando este é usado de acordo com as diretrizes da farmacopeia, para teste de produtos acabados em fármacos parenterais, produtos biológicos ou dispositivos médicos para uso animal ou humano⁸.

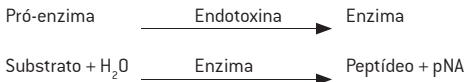
Explicação do ensaio

O Kínetic-QCL™ é um ensaio cinético quantitativo para detecção de endotoxinas de bactérias Gram-negativas. A amostra é misturada com o reagente LAL/substrato, colocada em uma leitora de microplacas sob incubação e monitorada automaticamente ao longo do tempo para detectar o surgimento de coloração amarela. O tempo até o surgimento de coloração amarela (tempo de reação) é inversamente proporcional à quantidade de endotoxina presente, ou seja, a reação ocorre rapidamente na presença de grandes quantidades de endotoxinas e é mais demorada se a quantidade de endotoxina for menor. Em amostras desconhecidas, a concentração de endotoxina pode ser calculada a partir de uma curva padrão.

O uso de LAL para detectar endotoxinas foi desenvolvido a partir das observações de Bang¹, que mostraram que a infecção por bactérias Gram-negativas provocava uma coagulação intravascular fatal em caranguejos-ferradura (*Limulus polyphemus*), também conhecidos como límulos. Posteriormente, Levin e Bang^{2,3} demonstraram que essa coagulação era causada por uma reação entre a endotoxina e uma proteína coagulável encontrada nos amebócitos circulantes do límulo. Após o desenvolvimento de anticoagulantes apropriados para sangue de límulo, Levin e Bang⁴ prepararam um lisado de amebócitos lavados, que se mostrou um indicador altamente sensível da presença de endotoxina. Solum^{5,6} e Young, Levin e Prendergast⁷ purificaram e caracterizaram a proteína coagulável do LAL e mostraram que a reação com a endotoxina é do tipo enzimática.

O método LAL atual emprega a parte inicial da reação de LAL com endotoxina para ativar uma enzima, que, por sua vez, libera p-nitroanilina (pNA) a partir de um substrato sintético, produzindo uma coloração amarela.

Princípio



A endotoxina de bactérias Gram-negativas catalisa a ativação de uma proenzima no LAL⁷. A taxa de ativação inicial depende da concentração de endotoxina presente. A enzima ativada catalisa a liberação de pNA a partir do substrato incolor (Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA). Em seguida, o pNA livre é medido por fotometria a 405 nm durante todo o período de incubação. A concentração de endotoxina na amostra é calculada comparando-se o seu tempo de reação com uma curva padrão.

Reagentes fornecidos e condições de armazenamento

Reagente Kinetic-QCL™ (K50-643) Frasco de rótulo amarelo

Cada frasco contém uma mistura liofilizada de lisado preparado a partir de amebócitos circulantes de caranguejo-ferradura (*Limulus polyphemus*) e um substrato cromogênico.

Reconstitua imediatamente antes de usar com 2,6 ml de Água Reagente LAL por frasco. Se precisar usar mais de um frasco, junte o conteúdo de dois ou mais frascos antes de usar. Agite suavemente para evitar a formação de espuma. O Reagente Liofilizado Kinetic-QCL™ deve ser armazenado a 2–8°C. Mantenha ao abrigo de exposição prolongada à luz.

O Reagente Kinetic-QCL™ deve ser usado rapidamente após reconstituído. O reagente Kinetic-QCL™ reconstituído se mantém estável por 8 horas a 2–8°C e pode ser armazenado a -10°C ou menos por até 2 semanas. Congele e degele apenas uma vez.

Endotoxina de *E. coli* 055:B5 (E50-643) Frasco de rótulo vermelho

O volume de reconstituição do frasco encontra-se indicado no Certificado de Análise (COA) e é calculado para gerar uma solução contendo 50 UE (ou UI)/ml. Reconstitua com o volume indicado de Água Reagente LAL. Agite vigorosamente por pelo menos 15 minutos em um agitador tipo vórtex em alta velocidade. Antes de usar uma solução estoque armazenada, deve-se aquecê-la até a temperatura ambiente e agitá-la vigorosamente em vórtex por 15 minutos. Isso é importante porque a endotoxina tende a aderir ao vidro. O COA está disponível em www.lonza.com/coa.

A Endotoxina Liofilizada de *E. coli* 055:B5 deve ser armazenada a 2–8°C. Soluções estoque de endotoxina permanecem estáveis por até quatro semanas a 2–8°C.

Observação: A endotoxina não vem incluída, mas é necessária para kits que contêm apenas lisado.

Esta endotoxina é incluída para conveniência do usuário. Outros preparados de endotoxina podem ser usados para preparar os padrões, mas seu desempenho no ensaio cromogênico precisa ser determinado em relação à Endotoxina Padrão de Referência [RSE].

Água Reagente LAL (W50-640) **Frasco de rótulo amarelo**

Cada frasco contém 30 ml de Água Reagente LAL. A água deve ser usada para reidratar o Reagente Kinetic-QCL™ e a Endotoxina de *E. coli*, assim como para preparar diluições de endotoxinas e amostras. A Água Reagente LAL é equivalente à Água para o Teste de Endotoxinas Bacterianas [BET].

A Água Reagente LAL deve ser armazenada a 2–8°C.

Observação: A Água Reagente LAL não vem incluída, mas é necessária para kits que contêm apenas lisado.

Materiais e equipamentos não incluídos

1. Tubos de diluição descartáveis de vidro e livres de endotoxina [13 × 100 mm, N° N207 ou equivalente].
2. Pipetas sorológicas em embalagens individuais.
3. Pipetas manuais automáticas com ponteiros Estéreis e apirogênicos em embalagens individuais ou em rack.

4. Microplacas estéreis, apirogênicas e descartáveis.
Observação: Antes do uso de rotina, as microplacas devem ser pré-qualificadas⁸ (nº 25-340 ou equivalente).
5. Reservatórios de reagentes (nº 00190035 ou equivalente).
6. Multipipetador de oito canais.
7. Hidróxido de sódio 0,1 N ou ácido clorídrico 0,1 N dissolvido em Água Reagente LAL para ajustar o pH da amostra se necessário.
8. Leitora de microplacas (Leitora ELx808™ nº 25-315S ou equivalente).
9. Software WinKQCL™.
10. Cronômetro.
11. Agitador tipo vórtex.
12. Para kits sem água: Água reagente LAL (nº W50-640, W50-100, W50-500 ou equivalente).
13. Padrão de endotoxina (Endotoxina Padrão de Controle correspondente-casada ao LAL).

Coleta e preparação da amostra

Deve-se empregar uma técnica cuidadosa para evitar contaminação microbiana ou por endotoxinas. Todos os materiais que entrarão em contato com a amostra ou reagentes de teste devem ser livres de endotoxinas. Para eliminar endotoxinas de vidrarias e outros materiais, aqueça-os a 250°C por 30 minutos. Precauções apropriadas devem ser seguidas para proteger os materiais contra contaminação ambiental após a despirogenização.

A experiência indica que a maioria das pipetas e ponteiras estéreis de plástico fornecidas em embalagens individuais não contém endotoxinas, mas todos esses materiais devem ser testados antes de serem usados regularmente.

Pode ser necessário ajustar o pH da amostra dentro do intervalo de 6,0–8,0 usando uma solução de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico livre de endotoxinas. Para evitar contaminação pelo eletrodo de pH, sempre meça o pH de uma alíquota da amostra total. Não ajuste soluções não tamponadas.

As amostras a serem testadas precisam ser armazenadas de forma que toda a atividade bacteriológica seja interrompida. Caso contrário, o nível de endotoxina pode aumentar ao longo do tempo. Por exemplo, armazene as amostras a 2–8°C por menos de 24 horas ou congele para períodos superiores a 24 horas. O usuário final é responsável por validar as condições de armazenamento e dos recipientes de suas amostras.

Se o recipiente do diluente usado para reidratar o Reagente Kinetic-QCL™ tiver sido aberto ou não tiver sido fornecido pela Lonza, o diluente precisa ser testado isoladamente para evitar a contaminação por endotoxinas.

Tipos de ensaio Kinetic-QCL™

A leitora de microplacas com incubação e o software WinKQCL™ são partes integrais do Ensaio Kinetic-QCL™. O usuário deve familiarizar-se com a operação da leitora de microplacas com incubação e com os recursos do Software WinKQCL™. Para obter informações mais detalhadas, consulte os manuais da leitora de microplacas ou os manuais de software e a ajuda do Software WinKQCL™.

Os Ensaio Kinetic-QCL™ podem ser de quatro (4) tipos diferentes. Cada um deles foi projetado para realizar um aspecto diferente dos ensaios à base de LAL.

1. Rotina

O ensaio de Rotina calcula as concentrações de endotoxina em amostras desconhecidas, comparando com o desempenho de uma série de padrões de endotoxinas.

O usuário pode incluir um Controle Positivo do Produto (PPC) no ensaio de Rotina para monitorar a inibição ou potencialização pelo produto (ver abaixo a Seção 2). Um PPC é uma amostra de produto à qual foi adicionada uma quantidade conhecida de endotoxina. O Software WinKQCL™ calcula automaticamente a quantidade de endotoxina recuperada do PPC, permitindo compará-la com a quantidade conhecida adicionada inicialmente.

2. Inibição/Aprimoramento

A reação LAL é mediada por enzimas e, portanto, possui um intervalo de pH ideal e necessidades específicas de sais e cátions divalentes. Em alguns casos, amostras de teste podem alterar essas condições ideais a tal ponto que o lisado torna-se insensível a endotoxinas. Resultados negativos com amostras que inibem o ensaio LAL nem sempre significam ausência de endotoxinas.

Os ensaios de Inibição/Aprimoramento foram projetados para determinar quais são os níveis de diluição do produto suficientes para superar a inibição ou a potencialização. Cada diluição do produto precisa ser acompanhada por um Controle Positivo do Produto (PPC). O Software WinKQCL™ calcula automaticamente a quantidade de endotoxina recuperada do PPC para comparação com a quantidade conhecida adicionada inicialmente. Deste modo, pode-se determinar as diluições de produtos que não interferem.

3. RSE/CSE

O ensaio RSE/CSE foi criado para determinar a potência de uma Endotoxina Padrão de Controle (CSE) em termos de concentração de uma Endotoxina Padrão de Referência (RSE).

O ensaio requer uma série única de diluições RSE e uma ou mais séries de diluições de CSE. Dependendo das unidades de concentração de CSE, o Software WinKQCL™ calcula automaticamente a potência média em termos de UE/ng ou UE/ml. O usuário também pode escolher outras unidades diferentes de UE ou ng.

4. Qualificação inicial

Um ensaio de Qualificação Inicial foi criado de acordo com as exigências da Farmacopeia⁸. **Esse ensaio é necessário para validar o ensaio LAL e deve ser realizado com cada lote novo de Kinetic-QCL™.**

O ensaio de Qualificação Inicial realiza uma correlação log/log linear dos valores de Tempo de Reação Individual para cada réplica de cada padrão de endotoxina. Os outros ensaios utilizam o Tempo Médio de Reação de todas as réplicas de cada padrão.

O ensaio de Qualificação Inicial não prevê a inclusão de nenhuma amostra.

Preparação de reagentes

Espere os reagentes atingirem a temperatura ambiente antes de usá-los.

Para calcular concentrações de endotoxinas em amostras desconhecidas, cada ensaio Kinetic-QCL™ precisa ser relacionado com uma curva padrão válida.

Como o intervalo de concentrações de endotoxinas a serem ensaiadas é grande, o intervalo quantitativo de qualquer exame pode ser ajustado modificando-se as concentrações dos padrões de endotoxina usados para gerar a curva padrão. São necessários pelo menos três padrões.

O Ensaio Kinetic-QCL™ foi otimizado para funcionar linearmente de 0,005 UE/ml a 50,0 UE/ml. Entretanto, o usuário pode truncar a curva padrão dependendo das necessidades específicas do produto a ser testado. Os dados indicam que a truncagem da curva padrão de LAL cromogênico cinético pode melhorar a eficácia da predição de valores de endotoxinas em amostras testadas. Antes de criar uma curva padrão de LAL cromogênico cinético para ensaios de rotina de produtos, recomenda-se ao usuário se familiarizar com as exigências da Farmacopeia para técnicas cinéticas envolvendo LAL⁸.

A tabela a seguir sugere um esquema de diluição para construir uma série de diluições de endotoxina a partir da endotoxina fornecida no kit. Nem todas as diluições precisam ser usadas para criar a curva padrão. Outros esquemas de diluição e outras endotoxinas que não as fornecidas no kit também podem ser empregados. Se a endotoxina empregada não for a incluída no kit, pode ser necessário realizar um ensaio de RSE/CSE para determinar a potência de RSE.

Observação: As diluições de endotoxina não devem ser realizadas em tubos de plástico.

Concentração de endotoxina [UE/ml]	Volume de Água Reagente LAL	Volume de solução de endotoxina adicionada à Água Reagente LAL
5,0	0,9 ml	0,1 ml de solução 50,0 UE/ml
0,5	0,9 ml	0,1 ml de solução 5,0 UE/ml
0,05	0,9 ml	0,1 ml de solução 0,5 UE/ml
0,005	0,9 ml	0,1 ml de solução 0,05 UE/ml

1. Prepare uma solução de endotoxina 5,0 UE/ml adicionando 0,1 ml da solução estoque de endotoxina 50,0 UE/ml a 0,9 ml de Água Reagente LAL em um recipiente apropriado e rotule-o com 5,0 UE/ml. Antes de ser usada, essa solução deve ser agitada vigorosamente em vórtex por pelo menos um minuto.
2. Transfira 0,1 ml da solução de endotoxina 5,0 UE/ml para 0,9 ml de Água Reagente LAL em um recipiente apropriado e rotule-o com 0,5 UE/ml. Antes de ser usada, a solução deve ser agitada vigorosamente em vórtex por pelo menos um minuto.
3. Transfira 0,1 ml da solução de endotoxina 0,5 UE/ml para 0,9 ml de Água Reagente LAL em um recipiente apropriado e rotule-o com 0,05 UE/ml. Antes de ser usada, essa solução deve ser agitada vigorosamente em vórtex por pelo menos um minuto.
4. Transfira 0,1 ml da solução de endotoxina 0,05 UE/ml para 0,9 ml de Água Reagente LAL em um recipiente apropriado e rotule-o com 0,005 UE/ml. Antes de ser usada, essa solução deve ser agitada vigorosamente em vórtex por pelo menos um minuto.

Procedimento de ensaio

Para obter informações mais detalhadas sobre como realizar o ensaio Kinetic-QCL™, consulte os manuais da leitora de microplacas com incubação e do software WinKQCL™.

1. Crie um **Modelo** específico para realizar o ensaio. Cada Modelo contém o nome do analista, tipo de ensaio, números de lote dos reagentes, número e concentração dos padrões de endotoxina, número de réplicas e a organização de amostras e padrões na microplaca.
2. O **Tipo de Ensaio** selecionado deve ser **Kinetic-QCL**. Os Parâmetros do Modelo padronizados mostrados a seguir não devem ser modificados sem qualificação prévia:

Delta t (segundos)	150
Filtro de medição (nm)	405
Delta mOD	200
Número de leituras	40

3. Imprima o Modelo para usá-lo como guia ao colocar os padrões e amostras na microplaca.
4. “Execute” o Modelo conforme as instruções do Software WinKQCL™.

5. Dispense cuidadosamente 100 µl da Água Reagente LAL (branco), os padrões de endotoxina, amostras de produto e controles positivos dos produtos e outros reagentes nos poços apropriados da microplaca. Consulte as instruções para o controle positivo do produto nas páginas 22–24.
6. Coloque a placa preparada na leitora de microplacas e feche a tampa.
7. Pré-incube a placa por ≥ 10 minutos a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
8. Quando o período de incubação estiver se aproximando do final, reconstitua um número apropriado de frascos de Reagente Kinetic-QCL™ com 2,6 ml de Água Reagente LAL por frasco. Misture bem e suavemente.
Observação: Não agite o lisado em vórtex.
9. Junte os reagentes em um Reservatório para reagentes e misture agitando-o suavemente de um lado a outro.
10. Usando um Multipipetador de oito canais, dispense 100 µl do Reagente Kinetic-QCL™ em todos os poços da microplaca, começando pela primeira coluna (A1-H1) e continuando em sequência até a última coluna. Adicione o reagente o mais rapidamente possível.
Observação: Evite a formação de bolhas!
11. Clique imediatamente no botão OK do Software WinQCL™ para iniciar o ensaio.
Observação: O Ensaio Kinetic-QCL™ é realizado com a microplaca destampada.

Características de desempenho

Linearidade

A linearidade da curva padrão no intervalo de concentração utilizado deve ser verificada para determinar os valores de endotoxina. Segundo os parâmetros para ensaios de **Qualificação Inicial**, pelo menos três padrões de endotoxina abrangendo o intervalo de concentração desejado e um branco de Água Reagente LAL devem ser ensaiados pelo menos em triplicata. Outros padrões devem ser incluídos de modo a abranger cada intervalo logarítmico ao longo da curva padrão.

O valor absoluto do coeficiente de correlação (r) da curva padrão calculada deve ser $\geq 0,980$.

Reprodutibilidade

Amostras idênticas devem ser testadas para estabelecer a técnica correta e reduzir os coeficientes de variação. O coeficiente de variação (CV) corresponde ao desvio padrão dos tempos de reação da “amostra” dividido pela média e é geralmente expresso em porcentagem. O %CV para réplicas deve ser inferior a 10%. Com a experiência, deve ser possível obter valores de 3–4%.

Cálculo das concentrações de endotoxina

A leitora de microplacas e o Software WinKQCL™ monitoram continuamente, durante todo o ensaio, a absorbância a 405 nm de cada poço da microplaca. O leitor determina o tempo necessário para a absorbância aumentar 0,200 unidades de absorbância usando a leitura inicial de cada poço como seu próprio branco. Este tempo é denominado **Tempo de Reação**. O Software WinKQCL™ realiza automaticamente uma correlação log/log linear do **Tempo de Reação** de cada padrão com a concentração correspondente de endotoxina. Os parâmetros da curva padrão são incluídos no relatório impresso. Se o valor absoluto do coeficiente de correlação (r) for $\geq 0,980$, pode-se construir um modelo polinomial para criar uma curva padrão e, assim, prever as concentrações de endotoxina nas amostras analisadas. O modelo de ajuste polinomial (POWERCURVE™) é um importante recurso do Software WinKQCL™ (ver POWERCURVE™ na página 20).

Regressão linear

As informações mostradas abaixo demonstram como o Software WinKQCL™ calcula a correlação log/log linear e calcula as concentrações de endotoxina em amostras onde ela é desconhecida. Esses cálculos não precisam ser realizados separadamente. Para cada amostra de cada produto, o Software WinKQCL™ calcula a concentração correspondente de endotoxina a partir do Tempo de Reação de cada amostra. O software ajusta automaticamente o **Resultado do Ensaio** considerando qualquer diluição do produto.

Correlação linear

Exemplos de cálculos

Padrões	Concentração	Tempo médio de reação (seg)	Concentração (log)	Tempo médio de reação (log)
Controle neg.	—	Não reativas	—	—
S1	0,005 UE/ml	4351	-2,301	3,639
S2	0,05 UE/ml	2496	-1,301	3,397
S3	0,5 UE/ml	1406	-0,301	3,148
S4	5,0 UE/ml	895	0,699	2,952
S5	50,0 UE/ml	561	1,699	2,749
Amostras				
1	—	1576	—	3,198
2	—	943	—	2,975

$$\text{Inclinação} = \left(\frac{\sum y}{\sum x} \right) r$$

Intercepto em Y = $\sum y / N - (\sum x / N \times \text{inclinação})$

$$r = \frac{N \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{N(N-1)S_x S_y}$$

$$\text{Concentração de endotoxina} = \text{antilog} \left[\frac{\log \text{Tempo de Reação Média} - \text{int. Y}}{\text{inclinação}} \right]$$

x = \log_{10} Concentração de endotoxina em UE/ml.

y = \log_{10} Tempo médio de reação.

N = Número de padrões utilizados.

$\sum x$ = Soma dos \log_{10} das concentrações em UE/ml dos padrões usados.

$\sum y$ = Soma dos \log_{10} dos Tempos de Reação.

$\sum xy$ = Soma dos \log_{10} das concentrações padrão vezes \log_{10} do Tempo Médio de Reação.

$$S_x = \text{Desvio padrão de } x = \sqrt{\frac{N\sum x^2 - (\sum x)^2}{N(N-1)}}$$

$$S_y = \text{Desvio padrão de } y = \sqrt{\frac{N\sum y^2 - (\sum y)^2}{N(N-1)}}$$

Cálculos usando dados da amostra:

$$N = 5$$

$$\sum x = -1,505 = (-2,301 - 1,301 - 0,301 + 0,699 + 1,699)$$

$$\sum y = 15,885 = (3,639 + 3,397 + 3,148 + 2,952 + 2,749)$$

$$\sum xy = -7,006 = (-2,301 \times 3,639) + (-1,301 \times 3,397) + (-0,301 \times 3,148) + (0,699 \times 2,952) + (1,699 \times 2,749)$$

$$S_x = 1,581$$

$$S_y = 0,352$$

$$r = \frac{5(-7,006) - (-1,505)(15,885)}{5(5-1)(1,581)(0,352)} = -0,999$$

$$\text{Inclinação} = \frac{0,352}{1,581} \times -0,999 = -0,222$$

$$\begin{aligned} \text{Intercepto em } Y &= \frac{15,885}{5} - \left[\frac{-1,505}{5} \times (-0,222) \right] \\ &= 3,177 - [(-0,301) \times (-0,222)] = 3,110 \end{aligned}$$

Amostra 1

$$\begin{aligned} \text{Conc. endotoxina UE/ml} &= \text{antilog} \left[\frac{3,198 - 3,110}{-0,222} \right] \\ &= \text{antilog} (-0,396) \\ &= 0,402 \text{ UE/ml} \end{aligned}$$

Amostra 2

$$\begin{aligned} \text{Conc. endotoxina UE/ml} &= \text{antilog} \left[\frac{2,975 - 3,110}{-0,222} \right] \\ &= \text{antilog} (0,608) \\ &= 4,056 \text{ UE/ml} \end{aligned}$$

POWERCURVE™

Se o valor absoluto do coeficiente de correlação (r) for $\geq 0,980$, pode-se construir um modelo polinomial para criar uma curva padrão e prever as concentrações de endotoxina nas amostras ensaiadas. Determinou-se que o modelo polinomial POWERCURVE™ torna a predição de concentrações de endotoxina mais precisa ao longo de todo o intervalo de concentrações de endotoxina (5 logs). O Modelo POWERCURVE™ requer o Software WinKQCL™.

Quando o POWERCURVE™ é usado, uma curva padrão é gerada a partir do \log_{10} dos valores dos Tempos de Reação e do \log_{10} das concentrações de endotoxina correspondentes a cada tempo para definir uma equação polinomial. A ordem da equação polinomial empregado para gerar a curva de regressão é determinada pelo número de padrões de endotoxina empregados no ensaio. A ordem do polinômio será sempre uma unidade menor que o número de padrões de endotoxina, podendo ser no máximo de quarta ordem para ensaios com cinco ou mais padrões de endotoxina e pelo menos de segunda ordem para ensaios com três padrões.

O Software WinKQCL™ POWERCURVE™ soluciona facilmente essas equações polinomiais. Os dados abaixo demonstram a solução de uma equação polinomial empregando o mesmo conjunto de dados do exemplo de correção linear na página 18.

Modelo polinomial (POWERCURVE™)

$$Y = A + BX + CX^2 + DX^3 + EX^4$$

$$A = 3,08374$$

$$B = -0,20432$$

$$C = 0,02894$$

$$D = -0,00596$$

$$E = -0,00503$$

Os parâmetros da curva padrão são impressos no laudo. O Software WinQCL™ POWERCURVE™ usa esses parâmetros para calcular a concentração correspondente de endotoxina a partir do Tempo de Reação de cada amostra. O software ajusta automaticamente o **Resultado do Ensaio** considerando qualquer diluição do produto.

É importante lembrar que o modelo polinomial POWERCURVE™ **NÃO PODE** ser usado para ensaios de **Qualificação Inicial**. Nesses ensaios, é preciso empregar a regressão linear. O Modelo Polinomial POWERCURVE™ foi avaliado apenas para Reagentes Kinetic-QCL™ e PYROGENT™-5000 fornecidos pela Lonza.

Inibição da reação pelo produto ensaiado

A inibição pelo produto ocorre quando substâncias presentes na amostra testada interferem na reação LAL. No Ensaio Kinetic-QCL™, esta inibição prolonga o Tempo de Reação, podendo produzir leituras de endotoxinas inferiores às realmente presentes na amostra ensaiada. A ausência de inibição pelo produto deve ser determinada especificamente para cada amostra, sem diluição ou após a diluição apropriada.

Para demonstrar a ausência de inibição pelo produto, deve-se adicionar uma quantidade conhecida de endotoxina a uma alíquota ou diluição da amostra a ser testada.

Recomenda-se adicionar endotoxina suficiente para produzir uma concentração final de 0,5 UE/ml de endotoxina na amostra. Em amostras que possam conter um teor basal de endotoxina >1 UE/ml, deve-se acrescentar endotoxina suficiente para produzir uma concentração final de 5,0 UE/ml.

Em um ensaio de Inibição/Aprimoramento, a solução com endotoxina (PPC) é ensaiada junto com a amostra sem endotoxina adicionada. As concentrações de endotoxina nas duas amostras e a endotoxina recuperada da amostra com endotoxina adicionada são calculadas automaticamente. A endotoxina recuperada deve ser igual à concentração conhecida da amostra com endotoxina adicionada, com diferença de 50–200%⁸.

Pode-se preparar uma alíquota com endotoxina adicionada da amostra (ou diluição) a ser ensaiada de uma das seguintes maneiras:

Método com tubos de ensaio

Transfira 50 µl da solução de 50,0 UE/ml para 4,95 ml da amostra (ou diluição) a ser ensaiada. A solução contém uma concentração de endotoxina de 0,5 UE/ml na amostra (ou diluição) a ser ensaiada. Agite a amostra vigorosamente em vórtex por um minuto antes de usar.

Transfira 100 µl desta solução para uma placa de 96 poços conforme as instruções no modelo do ensaio.

Método com placa nº 1

Transfira 10 µl da solução de 5,0 UE/ml para cada um dos poços PPC da placa de 96 poços conforme as instruções no modelo do ensaio. Adicione 0,1 ml da amostra (ou diluição) a ser testada a cada um desses poços. Cada poço conterá uma solução com 0,5 UE/ml. Misture suavemente, abrangendo os lados da placa.

Método com placa nº 2

Coloque 0,1 ml da amostra (ou diluição) a ser testada nos poços PPC da placa de 96 poços conforme as instruções no modelo do ensaio. Adicione 10 µl da solução 5,0 UE/ml a esses poços. Cada poço conterá uma solução com 0.5 UE/ml. Misture suavemente, abrangendo os lados da placa.

Se constatar que a amostra (ou diluição) testada inibe a Reação do Kineti-QCL™, pode ser necessário diluir mais a amostra até eliminar a inibição.

Exemplo: Identificação de uma diluição não inibitória

Diluição da amostra	Endotoxina recuperada
1/10	0,125 Inibitória
1/20	0,212 Inibitória
1/40	0,550 Não inibitória

Inicialmente, pode-se pesquisar se o produto é inibitório testando-se diluições 10:1 da amostra a ser testada. Quando a diluição não inibitória aproximada tiver sido determinada, pode-se encontrar a diluição exata testando-se diluições 2:1 em torno dessa diluição.

Limitações e indicações

O grau de inibição ou potencialização depende da concentração do produto. Se várias concentrações do mesmo produto forem testadas, deve-se estabelecer as características de desempenho de cada uma separadamente.

Padrões de inibição ou potencialização diferentes dos observados no ensaio convencional de LAL (formação de gel) podem ser encontrados.

Para superar a inibição, pode ser necessário ajustar o pH da amostra até o intervalo 6,0–8,0 usando uma solução de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico livre de endotoxinas.

Amostras coloridas

Como a leitura inicial de absorvância de cada poço é usada como branco para aquele poço, amostras com coloração significativa não criam nenhum problema específico. Se a cor de fundo for equivalente a $\geq 1,5$ unidades de absorvância, a amostra deve ser diluída e reensaiada.

Curva-padrão arquivada

O Software WinKQCL™ pode ser executado com uma curva-padrão arquivada. Se os números de lote do Reagente Kinetic-QCL™, da Água Reagente LAL e da endotoxina, além dos parâmetros da leitora de microplacas, corresponderem aos empregados para gerar uma curva-padrão arquivada válida, esta curva poderá ser usada em vez de colocar padrões de endotoxina novos na placa de 96 poços.

Se uma curva-padrão arquivada for empregada, deve-se ensaiar um ponto controle de padrão com concentração de endotoxina igual ao ponto médio (logarítmico) entre a maior e a menor concentração de endotoxina da curva-padrão arquivada. A concentração prevista de endotoxina deve estar no intervalo de $\pm 25\%$ do valor conhecido.

Por exemplo: em um ensaio com uma curva padrão com intervalo de 50,0 a 0,005 UE/ml, deve-se ensaiar um controle padrão com 0,5 UE/ml.

log 50,0	=	1,6990
log 0,005	=	-2,3010
<hr/>		
log médio	=	-0,3010
antilog -0,3010	=	0,5

Em um ensaio com uma curva padrão com intervalo de 1,0 a 0,01 UE/ml, deve-se ensaiar um controle padrão com 0,1 UE/ml.

log 1,0	=	0,0000
log 0,01	=	-2,0000
<hr/>		
log médio	=	-1,0000
antilog -1,0000	=	0,1

Correlação com outros métodos

Nos Estados Unidos, a FDA regula o uso oficial de ensaios com LAL. A potência das diferentes preparações de endotoxina é variável, tanto nos ensaios tradicionais de formação de gel como nos métodos cromogênicos. Os padrões de endotoxina incluídos neste kit foram comparados com a Endotoxina Padrão de Referência, USP (RSE) por meio do Ensaio Kinetic-QCL™. A potência é de 50,0 UE/ml após reconstituição usando o volume especificado no Certificado de Análise específico para cada lote. A curva de calibração diluída a partir deste padrão gerará um intervalo de 0,005 a 50,0 Unidades de Endotoxina/ml em relação à RSE. Entretanto, deve-se lembrar que os ensaios tradicionais de formação de gel são padronizados por diluições 2:1, de modo que as variações parecem significativas em comparação com as observadas no Ensaio Kinetic-QCL™, no qual a padronização é contínua e as variações são mínimas.

Observação para clientes fora dos EUA

Outras agências regulatórias podem adotar outros critérios de desempenho, que precisam ser atendidos para cumprir a regulamentação nas respectivas jurisdições.

Referências

1. Bang, F.B. A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 98:325 [1956].
2. Levin, J. & F.B. Bang. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 115:265 [1964].
3. Levin, J. & F.B. Bang. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 115:337 [1964].
4. Levin, J. & F.B. Bang. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 19:186 [1968].
5. Solum, N.O. Some characteristics of the clottable protein of *Limulus polyphemus* blood cells. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 23:170 [1970].
6. Solum, N.O. The coagulogen of *Limulus polyphemus* hemocytes. A comparison of the clotted and non-clotted forms of the molecule. *Thromb. Res.* 2:55 [1973].
7. Young, N.S., J. Levin, and R.A. Prendergast. An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: Evidence for enzymatic mechanism. *J. Clin. Invest.* 51:1790 [1972].
8. United States Pharmacopeial Convention. General Chapter <85> Bacterial Endotoxins Test. *United States Pharmacopeia* [USP].
9. European Directorate for the Quality of Medicines. Chapter 2.6.14 Bacterial Endotoxins Test. *European Pharmacopoeia* [EP].
10. Ministry of Health, Labour, and Welfare, General Chapter 4.0.1 Bacterial Endotoxins Test. *Japanese Pharmacopoeia* [JP].
11. U.S Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, *Guidance for Industry Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers* [June 2012].

Observações

Informações de contato

América do Norte

Atendimento ao cliente: +1 800 638 8174 (ligação gratuita)
order.us@lonza.com
Suporte científico: +1 800 521 0390 (ligação gratuita)
scientific.support@lonza.com

Europa

Atendimento ao cliente: +32 87 321 611
order.europe@lonza.com
Suporte científico: +32 87 321 611
scientific.support.eu@lonza.com

Outros países

Contact your local Lonza distributor
Atendimento ao cliente: +1 301 898 7025
Fax: +1 301 845 8291
scientific.support@lonza.com

Escritórios em outros países

Austrália	+61 3 9550 0883
Bélgica	+32 87 321 611
Brasil	+55 11 2069 8800
França	0800 91 19 81 (ligação gratuita)
Alemanha	0800 182 52 87 (ligação gratuita)
Índia	+91 40 4123 4000
Japão	+81 3 6264 0660
Luxemburgo	+32 87 321 611
Cingapura	+65 6521 4379
Países Baixos	0800 022 4525 (ligação gratuita)
Reino Unido	0808 234 97 88 (ligação gratuita)

Lonza Walkersville, Inc. – Walkersville, MD 21793

ELx808™ é marca registrada da BioTek Instruments, Inc.

Exceto onde indicado de outra maneira, todas as marcas registradas aqui mencionadas pertencem ao Lonza Group Ltd. ou a suas afiliadas. As informações aqui contidas correspondem aos mais recentes conhecimentos científico-tecnológicos e acredita-se estarem corretas. Entretanto, não estendemos nenhuma garantia, expressa ou implícita, quanto à precisão dos resultados obtidos com o uso de tais informações nem qualquer garantia, expressa ou implícita, quanto ao uso desses produtos. O comprador arcará com todos os riscos da utilização e/ou manuseio. Todos os usuários são obrigados a determinar, por conta própria, se os produtos fornecidos pelo Lonza Group Ltd. ou por suas afiliadas e se as informações e recomendações apresentadas pelo Lonza Group Ltd. ou suas afiliadas são: (i) apropriados para a finalidade ou propósito pretendido; (ii) atendem às regulamentações ambientais, de saúde e de segurança; e (iii) não infringem nenhum direito de propriedade intelectual de terceiros.

© 2015 Lonza

Todos os direitos reservados.

P50-650U-14-PT 07/15

RT-MN008-PT
