

Instrução de Uso - Kit IBMP Biomol Febre Amarela One  
IU-IVD-031  
Revisão: 02  
21/05/2026

## 1. NOME COMERCIAL

Kit IBMP Biomol Febre Amarela One.

## 2. DADOS DO FABRICANTE

INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ –  
IBMP – CNPJ: 03.585.986/0001-05  
RUA PROFESSOR ALGACYR MUNHOZ MADER, 3.775 I  
CEP 81350-010 – CURITIBA – PARANÁ – BRASIL  
Suporte e Assessoria Científica: 0800 400 4267  
Horário de atendimento: segunda à sexta-feira, das 8:30 às  
16:30 (exceto feriados).  
[sac@ibmp.org.br](mailto:sac@ibmp.org.br) | [www.ibmp.org.br](http://www.ibmp.org.br)

## 3. APRESENTAÇÃO

Kit contendo um módulo de amplificação, suficiente para 96  
determinações.

## 4. FINALIDADE

Este produto se destina à detecção qualitativa  
(presença/ausência) do material genético do vírus da febre  
amarela (YFV), extraído de amostras de soro, plasma e  
tecidos (fígado, baço, coração, pulmão, cérebro e rim), obtidas  
de indivíduos com suspeita de febre amarela.  
O resultado obtido, combinado com os dados clínicos e  
epidemiológicos do paciente, pode auxiliar no diagnóstico  
desta doença viral infecciosa febril aguda, que é transmitida  
por mosquitos vetores, e que se manifesta com sintomas como  
febre, dor de cabeça, icterícia, dores musculares, náusea,  
vômitos e fadiga.

## PRODUTO PARA USO EM DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

## 5. USUÁRIO PRETENDIDO

O teste deve ser realizado por profissionais da área da saúde  
com conhecimento em biologia molecular, especificamente em  
testes diagnósticos baseados em PCR em tempo real.

## 6. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO OU MANUSEIO

O armazenamento do produto deve ser feito entre -30°C e -  
15°C. A temperatura indicada para manipulação do produto é  
entre 15°C e 30°C.

A manipulação do conteúdo de cada módulo de amplificação  
deve ser feita com luvas descartáveis sem pó.

## 7. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO



O Kit IBMP Biomol Febre Amarela One utiliza a técnica da  
transcrição reversa seguida de reação em cadeia da  
polimerase em tempo real (RT-qPCR).

A reação de RT-qPCR permite a detecção de sequências  
nucleotídicas específicas no genoma do patógeno, em RNA  
extraído de soro, plasma e tecidos (fígado, baço, coração,  
pulmão, cérebro ou rim). Nessa técnica, ocorre uma etapa de  
transcrição reversa (geração de cDNA a partir do RNA extraído  
da amostra biológica) seguida da qPCR, na qual ocorre a  
avaliação da intensidade de fluorescência capturada ao final  
de cada ciclo da PCR.

O Kit IBMP Biomol Febre Amarela One permite a identificação  
do YFV, além de um controle interno (CI) endógeno. A  
detecção da presença de ácidos nucleicos do patógeno e do  
Controle Interno é feita através da utilização de sondas de  
hidrólise específicas para cada alvo molecular  
(oligonucleotídeos marcados com fluorescência), em reação  
multiplex.

A geração de uma curva de amplificação com formato típico  
para os alvos moleculares pesquisados demonstra uma  
reação com resultado detectável para a amostra. Amostras  
com resultados não detectáveis para os alvos moleculares  
pesquisados devem apresentar amplificação apenas do CI. A  
amplificação do CI indica o funcionamento adequado da  
reação (reagentes e operador), além de refletir a qualidade do  
RNA extraído da amostra. Caso o CI não seja detectado, a  
amostra deve ter seu material genético extraído novamente.  
Entretanto, é importante ressaltar que amostras apresentando  
amplificação para os alvos moleculares do patógeno devem  
ter seu resultado considerado válido independente da  
amplificação do CI.

O kit possui um Controle Positivo (CP) sintético biosseguro  
(que não oferece risco biológico aos operadores ou ao  
ambiente), que deve apresentar resultado detectável para  
todos os alvos moleculares pesquisados, incluindo o CI. O kit  
também possui um Controle Negativo (CN) que avalia as  
condições ambientais e experimentais e que deve apresentar  
resultado não detectável para o alvo pesquisado, exceto CI.  
Esse kit foi desenvolvido para a realização de análises de perfil  
qualitativo, ou seja, avalia apenas a presença ou ausência do  
alvo molecular. O produto não é validado para análise  
quantitativa.

Produto validado para uso com os seguintes termocicladores:  
7500 Real-Time PCR System, 7500 Fast Real-Time PCR  
System, QuantStudio 5 (Applied Biosystems), CFX96 Real-  
Time PCR Detection System (Bio-Rad) e Amplio 96 (Locus).

## 8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS

Amostras de RNA extraído de soro, plasma e tecidos (fígado,  
baço, coração, pulmão, cérebro e rim), obtidas de indivíduos  
com suspeita de febre amarela..

### 8.1. Condições para coleta, manuseio, preparo e preservação de amostras

#### Amostra de soro

As amostras devem ser coletadas conforme métodos  
convencionais de punção venosa em tubo sem anticoagulante  
ou com ativador de coágulo. Processar a amostra para  
obtenção do soro conforme métodos convencionais.  
Após a coleta e processamento, as amostras devem ser  
transportadas e permanecer armazenadas entre 2°C e 8°C por  
até 6 horas. Após esse período, as amostras devem ser  
armazenadas entre -90°C e -70°C.

#### Amostra de plasma

As amostras devem ser coletadas conforme métodos  
convencionais de punção venosa em tubo com anticoagulante  
(EDTA). Processar a amostra para obtenção do plasma  
conforme métodos convencionais.  
Após a coleta e processamento, as amostras devem ser  
transportadas e permanecer armazenadas entre 2°C a 8°C por  
até 6 horas. Após esse período, as amostras devem ser  
armazenadas entre -90°C e -70°C.

#### Amostra de tecidos

As amostras de tecido provenientes de fígado, baço, coração,  
pulmão, cérebro e rim devem ser coletadas em autópsia,  
conservadas *in natura* e não devem ser preservadas em  
formaldeído.  
Após a coleta, as amostras de tecido devem ser conservadas  
e transportadas entre -90°C e -70°C até o processamento.

### 8.2. Extração de RNA

Deve-se realizar a extração de RNA das amostras primárias  
utilizando metodologia adequada para a matriz biológica  
preconizada para o teste, e que permita obter RNA cuja  
qualidade e integridade resultem no atendimento aos critérios  
de análise estabelecidos no item 14.2 desta Instrução de Uso.

### 8.3. Cuidados no armazenamento e manuseio do RNA extraído

– RNA extraído deve ser armazenado entre -90°C e -70°C;



- Ciclos de congelamento e descongelamento do RNA extraído devem ser evitados para prevenir a degradação do material genético.
- Usar sempre luvas descartáveis sem pó durante o manuseio do RNA para prevenir contaminação por nucleases. Mãos e partículas de poeira podem carrear microrganismos, que são as fontes mais comuns desse tipo de contaminante;
- Manter os tubos contendo RNA fechados durante os procedimentos. Abrir um tubo de cada vez para realizar a adição à mistura de reação, para evitar que haja contaminação cruzada entre as amostras.

### 9. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O Kit IBMP Biomol Febre Amarela One é composto por um módulo de amplificação contendo:

- 01 microtubo de Master Mix contendo 650  $\mu\text{L}$ ;
- 01 microtubo de Oligomix contendo 950  $\mu\text{L}$ ;
- 01 microtubo de Controle Positivo (CP) contendo 110  $\mu\text{L}$ ;
- 01 microtubo de Controle Negativo (CN) contendo 110  $\mu\text{L}$ .

#### 9.1. Materiais necessários não fornecidos com o produto

- Adesivo não-óptico;
- Adesivo óptico;
- Agitador tipo vórtex;
- Banho de gelo ou estante refrigerada para microtubos de 1,5 ou 2,0 mL;
- Cabine do tipo PCR Workstation;
- Caneta para marcação permanente em plástico;
- Centrífuga para microtubos de 1,5 a 2,0 mL;
- Centrífuga para placas de 96 posições;
- Consumíveis e materiais para coleta e armazenamento da amostra primária;
- Equipamento de PCR em tempo real;
- Equipamentos de proteção individual (jaleco, máscara descartável, touca, luvas descartáveis sem pó, protetores de barba, óculos de segurança);
- Kit de extração de RNA;
- Micropipetas de precisão (0,5-10  $\mu\text{L}$ , 10-100  $\mu\text{L}$  e 100-1000  $\mu\text{L}$ );
- Microtubos de 1,5 ou 2,0 mL, estéreis e livres de nucleases;
- Placa de PCR (96 poços);
- Ponteiras livres de RNAses e DNAses com filtro (0,5-10  $\mu\text{L}$ , 10-100  $\mu\text{L}$  e 100-1000  $\mu\text{L}$ );
- Recipientes para descarte de resíduos;
- Suporte/estante para microtubos de 1,5 a 2,0 mL.

### 10. ESTABILIDADE DO PRODUTO EM USO

Esse é um produto de uso múltiplo.

O estudo de estabilidade demonstrou que o produto mantém sua qualidade por até vinte ciclos de descongelamento, após os quais eventuais sobras de reagentes devem ser descartadas.

Não é recomendado o congelamento/descongelamento da mistura de reação após o preparo.

### 11. PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS ANTES DA UTILIZAÇÃO DO PRODUTO

No momento do uso, os reagentes e amostras de RNA extraído devem ser descongelados, centrifugados brevemente e mantidos sob refrigeração utilizando banho de gelo ou estante refrigerada.

### 12. PROCEDIMENTOS DE CONTROLE DE QUALIDADE

- Utilizar equipamentos de proteção individual (EPI) tais como jaleco, máscara descartável, touca e luvas sem pó descartáveis, protetores de barba e óculos de segurança para a manipulação de amostras e reagentes;
- Não comer, beber, fumar, aplicar cosméticos ou manusear lentes de contato nas áreas laboratoriais;
- Não utilizar componentes do teste que estejam vencidos;
- A utilização das micropipetas deve respeitar a faixa de operação do instrumento;
- Evitar abrir a placa de PCR após a reação de amplificação para reduzir riscos de contaminação do ambiente;
- Realizar a manipulação de reagentes e amostras de RNA no interior de cabines tipo PCR *Workstation*.

### 13. PROCEDIMENTOS PARA O USO DO PRODUTO

#### 13.1. Preparo da mistura de reação

- Identificar o número de reações a serem realizadas, considerando a necessidade de inclusão de, pelo menos, um controle positivo e um controle negativo em cada corrida;
- Elaborar o mapa da placa de reação, identificando os poços a serem utilizados e a posição de aplicação de cada amostra, do controle positivo e do controle negativo;
- Calcular, conforme os volumes apresentados na Tabela 1, os volumes necessários para realização da corrida.

**OBS.:** Os volumes indicados não contemplam eventual perda durante o processo de pipetagem.

Tabela 1. Receita para preparo da mistura de reação do Kit IBMP Biomol Febre Amarela One.

Componente	Volume para uma reação
Master Mix	6 $\mu\text{L}$

Oligomix	9 $\mu\text{L}$
<b>TOTAL</b>	<b>15 <math>\mu\text{L}</math></b>

- Na área física apropriada, identificar um microtubo de 1,5 ou 2,0 mL para preparo da mistura de reação;
- Adicionar ao microtubo devidamente identificado, os componentes e volumes listados na Tabela 1, ajustados ao número de reações a serem realizadas;
- Homogeneizar gentilmente por vórtex suave, pipetagem ou tamborilando e centrifugar brevemente (*spin*);
- Distribuir 15  $\mu\text{L}$  da mistura de reação em cada poço de uma placa de PCR de 96 poços, seguindo o mapa da placa de reação;
- Selar a placa com adesivo não-óptico para transferi-la até a área de manipulação de amostras de ácidos nucleicos.

#### 13.2. Adição de amostras e controles

- Em área física apropriada e seguindo o mapa da placa de reação, adicionar 5  $\mu\text{L}$  de cada amostra de RNA extraído nos poços correspondentes na placa de reação;
- Adicionar 5  $\mu\text{L}$  do Controle Positivo (CP) no poço correspondente na placa de reação;
- Adicionar 5  $\mu\text{L}$  de Controle Negativo (CN) no poço correspondente na placa de reação;
- Selar a placa de reação com adesivo óptico;
- Centrifugar a placa brevemente (*spin*).

#### 13.3. Configurações de detecção e termociclagem

- Configurar o software do equipamento conforme mapa da placa de reação estabelecido pelo usuário, identificando a posição de cada amostra, do controle positivo e do controle negativo;
- Configurar as fluorescências para cada canal conforme Tabela 2.

Tabela 2. Alvos e fluorescências/canais a serem configurados para a análise.

Alvo	Fluoróforo	Quencher
YFV	FAM	None
CI	VIC	None

- Selecionar a referência passiva do equipamento como NONE, quando aplicável;
- Configurar os parâmetros de termociclagem da reação conforme Tabela 3;



Tabela 3. Parâmetros de termociclagem para o Kit IBMP Biomol Febre Amarela One.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Estágio 1	50	15 minutos	01
Estágio 2	95	02 minutos	01
Estágio 3	95	15 segundos	45
	60*	30 segundos	

\*Estágio para captura de fluorescência.

– Salvar arquivo e iniciar a corrida no equipamento.

## 14. ANÁLISE DOS RESULTADOS

### 14.1. Parâmetros de análise dos resultados

Para a análise de resultados, devem ser adotados os parâmetros descritos na Tabela 4, de acordo com o equipamento utilizado.

Tabela 4. Parâmetros analíticos a serem utilizados para os diferentes termocicladores.

Equipamentos	Alvos	Threshold	Baseline
7500, 7500 Fast, QuantStudio 5	YFV	100.000	6 – 15
	CI	10.000	6 – 15
CFX96	YFV	300	AUTO
	CI	100	6 – 15
Amplio 96	YFV	AUTO	AUTO
	CI	AUTO	AUTO

### 14.2. Interpretação dos resultados

- Para que uma corrida seja considerada válida, o Controle Positivo (CP) deve apresentar amplificação para todos os alvos avaliados, apresentando Ct ≤ 33;
- Para que uma corrida seja considerada válida, o Controle Negativo (CN) não deve apresentar amplificação para o alvo YFV e deve apresentar amplificação do controle interno (CI) com Ct ≤ 33;
- Para que uma amostra seja considerada negativa, não deve apresentar amplificação do alvo YFV, e deve apresentar amplificação do controle interno com Ct ≤ 36;
- Para que uma amostra seja considerada positiva, deve apresentar amplificação com curva de perfil típico para o alvo YFV com Ct ≤ 45, mesmo se não houver amplificação do controle interno.

Os critérios para interpretação de resultados estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Critérios para interpretação de resultados do Kit IBMP Biomol Febre Amarela One.

Amostra		CP*	CN*	Resultado
YFV	CI			
-	+	+	-	Vírus da Febre Amarela não detectável
+	+/-	+	-	Vírus da Febre Amarela detectável
-	-	+	-	Amostra inválida
+/-	+/-	+/-	+	Ensaio inválida
+/-	+/-	-	+/-	Ensaio inválido

\*Tanto o CP quanto o CN devem apresentar amplificação do CI dentro dos critérios estabelecidos no item 14.2.

### 14.2.1. Guia de resolução de possíveis resultados fora de critério de aceitação

- Amostras inválidas, ou seja, que não apresentarem amplificação do alvo YFV e não apresentarem amplificação do CI, ou amplificação do CI com Ct > 36, devem ter seu RNA extraído novamente;
- A amplificação do alvo YFV no Controle Negativo é indicativo de contaminação do ensaio e este deve ser repetido. A reincidência deste resultado indica a necessidade de adoção de protocolos de descontaminação mais eficientes;
- Amplificações dos alvos presentes no Controle Positivo e no Controle Negativo com Ct > 33 indicam falhas operacionais, contaminação por inibidores ou degradação dos insumos, indicando que devem ser utilizados protocolos de armazenamento e manuseio mais cuidadosos.

## 15. SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES OU LIMITAÇÕES DO PRODUTO

- O desempenho deste ensaio depende da coleta, conservação e transporte adequados da amostra para o local do ensaio (consulte a seção TIPOS DE AMOSTRAS E MATRIZES APLICÁVEIS nesta Instrução de Uso);
- Amostras de soro, plasma, tecidos (fígado, baço, coração, pulmão, cérebro ou rim) de humanos podem ser utilizadas com o Kit IBMP Biomol Febre Amarela One. O uso de outras matrizes biológicas não foi validado com o Kit IBMP Biomol Febre Amarela One;

- Os resultados obtidos com o Kit IBMP Biomol Febre Amarela One devem ser interpretados em conjunto com informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais do paciente. Um resultado “Não detectável” não exclui a possibilidade de infecção pelo vírus da febre amarela;
- Esse teste pode ser utilizado como ferramenta auxiliar de diagnóstico durante a fase aguda da doença, preferencialmente até o 5º dia do início dos sintomas, podendo ser realizado até o 10º dia, desde que em conjunto com a testagem sorológica (IgM).

## 16. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

### 16.1. Sensibilidade analítica

Para determinação do limite de detecção, foram testados seis pontos de diluição de RNA de YFV comercial quantificado, com concentrações de 100 a 0,10 cópias/reação, em oito réplicas cada.

O limite de detecção do Kit IBMP Biomol Febre Amarela One, com confiança de 95%, é de 3,88 cópias/reação (IC95% 2,37 a 9,31 cópias/reação) para o vírus da febre amarela.

### 16.2. Especificidade analítica

O Kit IBMP Biomol Febre Amarela One não apresentou detecção cruzada frente a análise de amostras conhecidamente positivas para os seguintes patógenos: vírus Chikungunya, vírus da Dengue (sorotipos 1, 2, 3 e 4), vírus da encefalite equina do leste, vírus da encefalite equina do oeste, vírus da encefalite equina venezuelana, vírus da encefalite de St. Louis, vírus da encefalite do carrapato, vírus do Nilo Ocidental, vírus Mayaro, vírus Rocio, vírus Ross River, vírus Zika, vírus da hepatite A, rinovírus humano, vírus sincicial respiratório humano (subtipo B), SARS-CoV-2, vírus influenza A, vírus da raiva e *Leptospira* sp.

### 16.3. Precisão

O Kit IBMP Biomol Febre Amarela One apresenta coeficientes de variação de repetibilidade e reprodutibilidade inferiores a 4% e 2%, respectivamente, em testes conduzidos por três operadores e três equipamentos distintos.

### 16.4. Desempenho diagnóstico

O desempenho diagnóstico do teste foi determinado através da análise de um painel de 348 amostras clínicas humanas, sendo 246 amostras de soro ou plasma humano e 102 amostras de tecidos humanos (fígado, baço, coração, pulmão, cérebro e rim), previamente caracterizadas utilizando



metodologia molecular. Os resultados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Desempenho diagnóstico do Kit IBMP Biomol Febre Amarela One.

		Método de Referência		
		Detectável	Não Detectável	TOTAL
Kit IBMP Biomol Febre Amarela One	Detectável	179	1	180
	Não Detectável	0	168	168
	TOTAL	179	169	348

O teste apresenta sensibilidade diagnóstica de 100% (CI95% 98,0% - 100%), especificidade diagnóstica de 99,4% (CI95% 96,8% - 100%), valor preditivo positivo de 99,4% (CI95% 96,2% - 99,9%) e valor preditivo negativo de 100% (CI95% 97,8% - 100%) para detecção do vírus da febre amarela.

#### 17. RISCOS RESIDUAIS IDENTIFICADOS

- Os procedimentos descritos nesta Instrução de Uso visam minimizar o risco de contaminação cruzada ou ambiental pelo produto amplificado. No entanto, o risco de contaminação com ácido nucléico proveniente de outras fontes deve ser mitigado por meio da adoção de boas práticas de laboratório;
- O Controle Positivo deve ser tratado como uma amostra positiva. Mesmo não apresentando risco biológico para humanos, o Controle Positivo deve ser manipulado com extremo cuidado para que não ocorra contaminação acidental de amostras ou do ambiente, o que pode levar a resultados falso-positivos;
- Realizar a descontaminação periódica de ambientes, bancadas e instrumentos utilizando agente descontaminante apropriado para áreas de trabalho em Biologia Molecular;
- Realizar os processos de extração de ácidos nucleicos, o preparo de misturas de reação e a etapa de PCR em áreas físicas distintas para reduzir o risco de contaminação de reagentes, amostras e do ambiente;
- Recomenda-se realizar o monitoramento periódico das instalações laboratoriais para garantir que não haja contaminação ambiental por ácidos nucleicos ou produtos de PCR que possam levar a resultados falso-positivos.

#### 18. DESCARTE DE RESÍDUOS

Os resíduos gerados após o uso do produto devem ser descartados em locais apropriados e destinados ao tratamento adequado de acordo com a legislação vigente local.

#### 19. TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO COMERCIAL

- O produto deve ser utilizado dentro do prazo de validade determinado pelo fabricante;
- O fabricante não se responsabiliza pelos resultados obtidos, caso o usuário não siga corretamente as instruções de uso e condições de armazenamento dos insumos;
- Devem ser utilizados instrumentos de medição e detecção calibrados e/ou qualificados, sempre que aplicável;
- As condições de coleta e armazenamento de amostras impactam diretamente na qualidade do resultado obtido pelo Kit IBMP Biomol Febre Amarela One. Amostras coletadas e armazenadas em desacordo com o preconizado no item 8 desta Instrução de Uso podem gerar resultados falsos;
- Os parâmetros de desempenho apresentados nesta Instrução de Uso são aplicáveis para a análise de amostras de RNA obtidas de soro, plasma, tecidos (fígado, baço, coração, pulmão, cérebro ou rim) de humanos, o uso de RNA extraído de outras matrizes biológicas não foi validado para o Kit IBMP Biomol Febre Amarela One;
- O produto pode ser utilizado com os equipamentos constantes no item 7 desta Instrução de Uso.