Instrução de Uso
Kit IBMP Biomol ZDC One
IU-RUO-006
Revisão 00
09/11/2026

TESTE MOLECULAR

IBMP·Biomol

1. NOME COMERCIAL
Kit IBMP Biomol ZDC 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
CEP 81350-010 – CURITIBA – PARANÁ – BRASIL
Horário de atendimento: segunda à sexta-feira, das 8:30 às 16:30 (exceto feriados).
Suporte e Assessoria Científica: 0800 400 4267
sac@ibmp.org.br | 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 do material genético do vírus Zika (ZIKV), dos quatro sorotipos do vírus da Dengue (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4) e do vírus Chikungunya (CHIKV), extraído de amostras de *pools* de mosquitos *Aedes* spp., *Anopheles* spp., *Culex* spp. e *Haemagogus* spp..

PRODUTO PARA USO EM PESQUISA.

5. USUÁRIO PRETENDIDO
O teste deve ser realizado por profissionais com conhecimento específico em biologia molecular, especificamente em testes baseados em PCR em tempo real.

6. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO OU MANUSEIO E ESTABILIDADE
O armazenamento do produto deve ser feito entre -30°C e -15°C.
Esse é um produto de uso múltiplo. O produto mantém sua qualidade por até 5 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.
A temperatura indicada para manipulação do produto é entre 15°C e 30°C.

7. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO
O Kit IBMP Biomol ZDC One utiliza a técnica de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR).
A RT-qPCR permite a detecção de sequências nucleotídicas específicas no genoma dos patógenos em RNA extraído de *pool* de mosquitos vetores. Nessa técnica, ocorre uma etapa de transcrição reversa, com geração de cDNA a partir do RNA extraído da amostra biológica, seguida da qPCR, na qual a intensidade de fluorescência é avaliada ao final de cada ciclo de amplificação.
O kit permite a identificação do vírus Zika, dos sorotipos 1 a 4 do vírus da Dengue e do vírus Chikungunya através da detecção multilocus para cada alvo viral, além de um controle interno (CI) endógeno. A detecção dos ácidos nucleicos dos alvos pesquisados e do CI é realizada por meio de sondas de hidrólise marcadas com fluoróforos, específicas para cada alvo, em reação multiplex combinatória única. A PCR em tempo real multiplex combinatória permite a detecção de um alvo por meio da combinação de fluoróforos, ampliando o número de alvos que podem ser analisados em uma única reação.

8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS
Amostras de RNA extraído de *pools* de mosquitos *Aedes* spp., *Anopheles* spp., *Culex* spp. e *Haemagogus* spp..

8.1 Condições de coleta, manuseio, preparo ou preservação de amostras
A coleta deve ser realizada conforme métodos de rotina para a matriz preconizada, com cuidado, a fim de evitar contaminação cruzada com outras amostras.

Amostra de vetores
Amostras de vetores *Aedes* spp., *Anopheles* spp., *Culex* spp. e *Haemagogus* spp. podem ser usadas com os mosquitos inteiros isolados ou em *pool* com até 20 indivíduos por tubo.
Após a coleta, as amostras de vetores 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 resulte no atendimento aos critérios de análise estabelecidos no item 13.2 desta Instrução de Uso.

8.3 Cuidados no armazenamento e manuseio do RNA extraído
– Caso seja necessário, o armazenamento do RNA extraído deve ser realizado entre -90°C e -70°C;
– Ciclos de congelamento de descongelamento do RNA devem ser evitados para prevenir a degradação do material genético;
– Manter os tubos contendo RNA extraído 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
Kit IBMP Biomol ZDC One é composto por um módulo de amplificação contendo os componentes descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Componentes fornecidos no Kit IBMP Biomol ZDC One.

Componente	Quantidade
Master Mix	1 x 650 µL
Oligomix	1 x 950 µL
Controle Positivo 1 (CP1)	1 x 30 µL
Controle Positivo 2 (CP2)	1 x 30 µL
Controle Positivo 3 (CP3)	1 x 30 µL
Controle Positivo 4 (CP4)	1 x 30 µL
Controle Negativo (CN)	1 x 30 µL

9.1 Materiais necessários não fornecidos com o produto
– Adesivo não-óptico para selagem de placas;
– Adesivo óptico para selagem de placas;
– Agitador tipo vórtex;
– Banho de gelo ou rack refrigerada para microtubos de 1,5 ou 2,0 mL;
– Cabine de preparação de amostras tipo PCR Workstation;
– Caneta para marcação permanente para identificação de materiais plásticos;
– Centrífuga para microtubos de 1,5 a 2,0 mL;
– Centrífuga para microplacas de 96 poços;
– Equipamento de PCR em tempo real;
– Equipamentos de proteção individual (EPI) aplicáveis, tais como jaleco, máscara descartável, touca, luvas descartáveis sem pó e protetores de barba;
– Kit de extração de RNA;
– Materiais para coleta e armazenamento da amostra primária;

– Micropipetas de precisão (0,5-10 µL ≤ volume ≤ 1000 µL);
– Microplaca de PCR (96 poços);
– Microtubos de 1,5 ou 2,0 mL, estéreis e livres de nucleases;
– Ponteiras com filtro, estéreis e livres de nucleases, compatíveis com as micropipetas utilizadas;
– Rack para microtubos de 1,5 a 2,0 mL;
– Recipientes apropriados para descarte de resíduos.

10. 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 rack refrigerada.

11. PROCEDIMENTOS DE CONTROLE DE QUALIDADE

– Sempre usar luvas descartáveis sem pó durante o manuseio de amostras e reagentes para prevenir a contaminação por nucleases;
– Não comer, beber, fumar, aplicar cosméticos ou manusear lentes de contato nas áreas laboratoriais;
– Não utilizar componentes do teste que estejam vencidos;
– Respeitar a faixa de operação das micropipetas;
– Realizar os processos de extração dos ácidos nucleicos, o preparo da mistura de reação e a etapa de PCR em áreas físicas distintas para reduzir o risco de contaminação de reagentes, amostras e do ambiente;
– 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 no interior de cabines tipo PCR Workstation;
– Realizar a descontaminação periódica de ambientes, bancadas e instrumentos, utilizando agente descontaminante apropriado para áreas de trabalho em Biologia Molecular;
– 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.

12. PROCEDIMENTOS PARA O USO DO PRODUTO

12.1 Preparo da mistura de reação

– Identificar o número de reações a serem realizadas, considerando a necessidade de inclusão dos quatro CP's e um CN em cada corrida;
– Elaborar o mapa da placa de reação, identificando os poços a serem utilizados e a posição de aplicação de cada amostra, dos CP's e do CN;
– Calcular, conforme os volumes apresentados na Tabela 2, os volumes necessários para realização da corrida.
Obs.: Os volumes indicados não contemplam eventual perda durante o processo de pipetagem.

Tabela 2. Receita para preparo da mistura de reação do Kit IBMP Biomol ZDC One.

Componente	Volume para uma reação
Master Mix	6 µL
Oligomix	9 µL
Total	**15 µL**

– Em área física apropriada, identificar um microtubo de 1,5 ou 2,0 mL para o preparo da mistura de reação;
– Adicionar ao microtubo, devidamente identificado, os componentes e volumes listados na Tabela 2, ajustados ao número de reações a serem realizadas;
– Homogeneizar gentilmente a mistura de reação por vórtex suave ou pipetagem e centrifugar brevemente (spin).
– Distribuir 15 µL 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.

12.2 Adição de amostras e controles

– Em área física apropriada e seguindo o mapa da placa de reação, adicionar 5 µL de cada amostra de RNA extraído nos poços correspondentes na placa de reação;
– Adicionar 5 µL de cada um dos quatro Controles Positivos (CP1, CP2, CP3 e CP4) nos respectivos poços correspondentes na placa de reação;
– Adicionar 5 µL de CN no poço correspondente na placa de reação;
– Selar a placa com adesivo óptico;
– Centrifugar a placa brevemente (spin).

12.3 Configurações de detecção e termociclagem

– Configurar no software do equipamento conforme mapa da placa de reação estabelecido, identificando a posição de cada amostra e dos controles (dos quatro CP's e do CN);
– Configurar os canais de fluorescência conforme a Tabela 3.

Tabela 3. Alvos e fluorescências/canais a serem configurados para a análise.

Alvo[1]	Fluoróforo repórter	*Quencher*
FAM	FAM	*None*
JOE (ou VIC[2])	JOE (ou VIC[2])	*None*
ROX	ROX	*None*
CI	CY5	*None*

[1] Os alvos dependem da combinação de fluoróforos, como descrito no item 13.2.
[2] Escolher o canal de acordo com o termociclador em tempo real: JOE para 7500 e QuantStudio 5, VIC para CFX96.

– Selecionar a referência passiva do equipamento como NONE;
– Configurar os parâmetros de termociclagem da reação conforme a Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros de termociclagem para o Kit IBMP Biomol ZDC One.

Etapa	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Estágio 1	50 °C	15 minutos	01
Estágio 2	95 °C	02 minutos	01
Estágio 3	95 °C	15 segundos	40
	60 °C*	60 segundos	

*Estágio para captura de fluorescência.

– Salvar o arquivo e iniciar a corrida no equipamento.

13. ANÁLISE DOS RESULTADOS

13.1 Parâmetros de análise dos resultados

Para análise dos resultados devem ser adotados os parâmetros descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros de análise recomendados de acordo com o equipamento utilizado.

Equipamento	Alvo	*Threshold*	*Baseline*
7500 e QuantStudio 5	FAM	15.000	3 – 15
	JOE	15.000	3 – 15
	ROX	15.000	3 – 15
	CY5	15.000	3 – 15
CFX96	FAM	100	AUTO
	VIC	100	AUTO

Equipamento	Alvo	*Threshold*	*Baseline*
	ROX	100	AUTO
	CY5	100	AUTO

13.2 Interpretação dos resultados

– Para que uma corrida seja considerada válida, os quatro controles positivos (CP1, CP2, CP3 e CP4) devem apresentar amplificação com Ct ≤ 33, conforme especificado na Tabela 6;

Tabela 6. Critérios de validação dos controles positivos do Kit IBMP Biomol ZDC One.

Controle	Alvo	Fluoróforo
CP1	DENV1	FAM
	DENV2	ROX
	CHIKV	JOE/VIC
	CI	CY5
CP2	ZIKV	JOE/VIC + ROX
	CI	CY5
CP3	DENV3	FAM + JOE/VIC
	CI	CY5
CP4	DENV4	FAM + ROX
	CI	CY5

– Para que uma corrida seja considerada válida, o Controle Negativo (CN) não deve apresentar amplificação para os canais FAM, JOE (ou VIC) e ROX, e deve apresentar amplificação no canal CY5 (CI) com Ct ≤ 33;

– Para que uma amostra seja considerada negativa, não deve apresentar amplificação nos canais FAM, JOE (ou VIC) e ROX, e deve apresentar amplificação do canal CY5 (CI) com Ct ≤ 36;

– Para que uma amostra seja considerada positiva para ZIKV, deve apresentar amplificações com duas curvas de perfil típico para os fluoróforos JOE (ou VIC) e ROX simultaneamente, com diferença máxima de 3 Cts entre elas, como observado no CP2, mesmo se não houver amplificação do CI;

– Para que uma amostra seja considerada positiva para DENV1, deve apresentar amplificação com curva de perfil típico somente para o alvo FAM com Ct ≤ 36, mesmo se não houver amplificação do CI;

– Para que uma amostra seja considerada positiva para DENV2, deve apresentar amplificação com curva de perfil típico somente para o alvo ROX com Ct ≤ 36, mesmo se não houver amplificação do CI;

– Para que uma amostra seja considerada positiva para DENV3, deve apresentar amplificações com curvas de perfil típico para os fluoróforos FAM e JOE (ou VIC) simultaneamente, com diferença máxima de 3 Cts entre elas, como observado no CP3, mesmo se não houver amplificação do CI;

– Para que uma amostra seja considerada positiva para DENV4, deve apresentar amplificações com curvas de perfil típico para os fluoróforos FAM e ROX simultaneamente, com diferença máxima de 3 Cts entre elas, como observado no CP4, mesmo se não houver amplificação do CI;

– Para que uma amostra seja considerada positiva para CHIKV, deve apresentar amplificação com curva de perfil típico somente para o fluoróforo JOE (ou VIC) com Ct ≤ 36, mesmo se não houver amplificação do CI;

Os critérios para interpretação de resultados estão sumarizados na Tabela 7.

Tabela 7. Critérios para interpretação de resultados do Kit IBMP Biomol ZDC One.

Amostra				CP's	CN		Resultado
FAM	JOE ou VIC	ROX	CY5		Alvos virais	CI	
-	-	-	+	+	-	+	Não detectável
-	+	+	+/-	+	-	+	ZIKV detectável
+	-	-	+/-	+	-	+	DENV1 detectável
-	-	+	+/-	+	-	+	DENV2 detectável
+	+	-	+/-	+	-	+	DENV3 detectável
+	-	+	+/-	+	-	+	DENV4 detectável
-	+	-	+/-	+	-	+	CHIKV detectável
+	+	+	+/-	+	-	+	Amostra inconclusiva
-	-	-	-	+	-	+	Amostra inválida
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	Ensaio inválido
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	Ensaio inválido
+/-	+/-	+/-	+/-	-*	+/-	+/-	Ensaio inválido

*Falha de amplificação para qualquer um dos quatro CP's.

13.2.1 Guia de resolução de possíveis resultados fora dos critérios de aceitação

– **Curvas atípicas ou Cts ≤ 5**: Amostras com valores de Ct ≤ 5 ou ruído podem resultar de artefatos de análise devido a leituras abaixo do Baseline. Nestes casos, recomenda-se a verificação de amplificação na aba "Multicomponent plot". Caso sejam usados os equipamentos 7500 e QuantStudio 5, é indicado que as análises sejam realizadas utilizando o software Design and Analysis, versão 2.7.0 (ou superior);

– **Amplificação em dois canais simultaneamente com diferença de Cts > 3, ou detecção simultânea de FAM, JOE (ou VIC) e ROX**: Devido à forma como os resultados do Kit IBMP Biomol ZDC One são interpretados para os alvos DENV3, DENV4 e ZIKV, alvos com amplificação combinatória só são considerados com resultado detectável quando dois canais, entre FAM, JOE (ou VIC) ou ROX, apresentarem amplificação com diferença máxima de 3 Cts, com perfil semelhante ao observado no respectivo CP (ver Tabela 6). Amostras com amplificações simultâneas com diferença superior a 3 Cts para os fluoróforos FAM, JOE (ou VIC) e ROX, ou detecções simultâneas nestes três canais devem ser interpretadas como inconclusivas e são sugestivas de coinfecção. Essa possibilidade deve ser investigada através do Kit IBMP Biomol ZDC;

– **Amostras com Ct > 36 nos canais FAM, JOE (ou VIC) ou ROX**: Amostras que apresentarem curvas somente para um dos canais, FAM, JOE (ou VIC) ou ROX, com ou sem amplificação do canal Cy5 (CI), são consideradas inconclusivas;

– **Amostras inválidas**: Amostras que apresentarem amplificação do canal Cy5 (CI) com Ct > 36, na ausência de amplificação nos canais FAM, JOE (ou VIC) e ROX, devem ter seu RNA extraído novamente;

– **Contaminação do CN**: A amplificação de alvos virais, canais FAM, JOE (ou VIC) ou ROX, no CN é indicativa de contaminação do ensaio. Neste caso, o ensaio molecular deverá ser repetido. A reincidência deste resultado indica a necessidade de adoção de protocolos de descontaminação mais eficientes;

– **Ct tardio nos controles do kit**: Amplificações dos alvos correspondentes nos quatro CP's e no CN 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.

IBMP·Biomol TESTE MOLECULAR

14. SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES OU LIMITAÇÕES DO PRODUTO

– O desempenho deste ensaio depende da coleta, conservação e transporte adequados da amostra para o local do ensaio (para mais detalhes, consultar o item 8 desta Instrução de Uso);

– Amostras de pools de mosquitos vetores podem ser utilizadas com o Kit IBMP Biomol ZDC One. O uso de outras matrizes biológicas de origem animal não foi validado com este produto;

– Os resultados obtidos com o Kit IBMP Biomol ZDC One devem ser interpretados em conjunto com informações epidemiológicas e laboratoriais. Um resultado "Não detectável" não exclui a possibilidade de contaminação pelos vírus Zika, sorotipos do vírus da Dengue ou vírus Chikungunya.

15. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO APLICÁVEIS AO USO EM PESQUISA

15.1 Sensibilidade analítica

O limite mínimo de detecção do Kit IBMP Biomol ZDC One, com confiança de 95%, é de:

– 29,3 cópias/reação (IC95% 7,4 a 447,0) para ZIKV;
– 48,0 cópias/reação (IC95% 12,9 a 398,0) para DENV1;
– 22,9 cópias/reação (IC95% 9,8 a 79,6) para DENV2;
– 40,0 cópias/reação (IC95% 12,4 a 246,9) para DENV3;
– 52,1 cópias/reação (IC95% 16,8 a 276,8) para DENV4;
– 82,9 cópias/reação (IC95% 18,8 a 854,5) para CHIKV.

15.2 Especificidade analítica

O kit não apresentou detecção cruzada frente a análise de amostras conhecidamente positivas para os seguintes patógenos: 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 da febre amarela, vírus do Nilo Ocidental, vírus Mayaro, vírus Oropouche, vírus Rocio, vírus Ross River, vírus da hepatite A, Adenovírus, Parainfluenza humano 1, Parainfluenza humano 3, Rinovírus humano, SARS-CoV-2, Vírus sincicial respiratório humano (subtipo B), vírus Influenza A H1N1, vírus influenza A H3, vírus influenza B, vírus da raiva, *Leptospira borgpetersenii* e *L. interrogans*.

15.3 Precisão

O Kit IBMP Biomol ZDC One apresenta coeficientes de variação de repetibilidade e reprodutibilidade inferiores a 10,9% e 3,4%, respectivamente, em testes conduzidos por três operadores em três equipamentos distintos.

16. RISCOS RESIDUAIS IDENTIFICADOS

Os riscos associados ao Kit IBMP Biomol ZDC One foram identificados, analisados e avaliados por meio do processo de gerenciamento de riscos. Sempre que necessário, foram implementadas medidas de controle apropriadas, sendo que os riscos residuais remanescentes foram considerados aceitáveis em relação aos benefícios proporcionados pelo produto para sua finalidade pretendida. Entre os riscos residuais identificados, destacam-se:

– Resultados falso-negativos podem ocorrer quando a concentração do alvo da amostra estiver abaixo do limite de detecção (LoD) do ensaio;

– Resultados falso-negativos decorrentes de mutações ou variações genéticas nas regiões-alvo reconhecidas pelos iniciadores (primers) e/ou sondas, que possam comprometer a eficiência da amplificação e/ou detecção do agente patogênico; e

– Resultados falso-positivos decorrentes de contaminação cruzada entre amostras, reagente ou por produtos de amplificação, caso não sejam observadas as boas práticas laboratoriais.

– Para minimizar a ocorrência desses riscos, o produto deve ser utilizado de acordo com as instruções, advertências, limitações e precauções estabelecidas nessas Instruções de Uso.

17. 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.

18. TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

– 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 ZDC One. Amostras coletadas e armazenadas em desacordo com o preconizado no item 8 desta Instrução de Uso podem gerar resultados falsos;

– Este produto é validado para o uso com os termocicladores 7500 Real-time PCR System; QuantStudio 5 (Applied Biosystems) e CFX96 (Bio-Rad);

– Por se tratar de um produto baseado em metodologia molecular, o produto é isento de registro no MAPA, conforme art. 44, inciso XVI, do Decreto n° 5.053/2004.