

1. NOME COMERCIAL

Kit IBMP Biomol Chagas.

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 (presença/ausência) do material genético de *Trypanosoma cruzi* em DNA total extraído de amostras de sangue total ou de mistura de sangue total com solução de guanidina de pacientes com suspeita de Doença de Chagas.

O resultado obtido pode ser utilizado, em conjunto com os dados clínicos e epidemiológicos do paciente, para auxiliar e/ou confirmar o diagnóstico da doença de Chagas.

USO EM DIAGNÓSTICO IN VITRO.**5. USUÁRIO PRETENDIDO**

O teste deve ser realizado por profissionais da área de saúde, devidamente habilitados, 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 do módulo de amplificação deve ser feita com luvas descartáveis sem pó.

7. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O Kit IBMP Biomol Chagas utiliza a técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

A reação de qPCR permite a detecção de sequências nucleotídicas específicas no genoma do patógeno, em DNA extraído de amostras de sangue total ou mistura de sangue total com solução de guanidina, a partir da avaliação de intensidade de fluorescência capturada ao final de cada ciclo da PCR.

O Kit IBMP Biomol Chagas permite a identificação do *Trypanosoma cruzi*, através da detecção de um alvo molecular



específico, além de um controle interno de amplificação (IAC) exógeno. A detecção da presença de ácidos nucleicos de *T. cruzi* e do IAC 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 IAC. A amplificação do IAC indica o funcionamento adequado da reação (reagentes e operador), além de refletir a qualidade do DNA extraído da amostra. Caso o IAC não seja detectado, a amostra deve ter seu material genético extraído novamente.

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 *T. cruzi* tanto na concentração 1.000 cópias/μL (fornecida) quanto na concentração de 10 cópias/μL (a ser preparada pelo usuário). Também acompanha o kit o IAC 20x, que deve ser adicionado às amostras antes da extração, e diluído para uso na concentração 1x. Além disso, o kit contém um Controle Negativo (CN) que avalia as condições ambientais e experimentais e que deve apresentar resultado não detectável para todos os alvos pesquisados.

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 o seguinte termociclador: 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS

Amostras de DNA extraído de sangue total ou mistura de sangue total com solução de guanidina.

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

A coleta deve ser realizada conforme métodos de coleta de rotina para a matriz preconizada, com cuidado, a fim de evitar a contaminação com outras amostras coletadas simultaneamente.

Amostra de sangue total

As amostras devem ser coletadas conforme métodos convencionais de punção venosa utilizando tubo com anticoagulante (EDTA). A amostra de sangue total deve ser utilizada imediatamente.

Amostra de mistura de sangue total com solução de guanidina

As amostras devem ser coletadas conforme métodos convencionais de punção venosa utilizando tubo com anticoagulante (EDTA). O sangue total deve ser misturado à solução de guanidina, não fornecida com o kit, em frasco adequado, na razão amostra/solução 1:1 (v/v). A mistura GEB (*Guanidine-EDTA-Blood*) deve ser aquecida a 95°C por 15 minutos e, assim, pode ser armazenada a 4°C por tempo indeterminado.

8.2. Extração de DNA

Deve-se realizar a extração do DNA das amostras primárias utilizando o kit de extração DNA *High Pure PCR Template Preparation* (Roche Life Sciences) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante com as adaptações apresentadas abaixo, o qual permite obter DNA com a qualidade e integridade necessária para o atendimento aos critérios de análise estabelecidos no item 14.2 desta Instrução de Uso.

Antes da extração das amostras, 5 μL do Controle Interno de Amplificação (IAC 20x), fornecido no kit, devem ser adicionados a cada uma das amostras primárias.

Amostra de sangue total

Recomenda-se que a extração do DNA de sangue total obtido por punção venosa seja realizada conforme protocolo do fabricante do kit de extração DNA *High Pure PCR Template Preparation* (Roche Life Sciences), exceto pelo uso de 100 μL de volume de eluição, ao invés de 200 μL.

Amostra de mistura de sangue total com solução de guanidina

Deve-se realizar a extração de DNA da mistura GEB conforme protocolo do fabricante do kit de extração DNA *High Pure PCR Template Preparation* (Roche Life Sciences) com três adaptações: deve-se utilizar um volume de amostra de 300 μL de GEB, diminuir o volume de Binding Buffer para 100 μL e eluir o DNA com 100 μL do tampão recomendado.

8.3. Cuidados no armazenamento e manuseio do DNA extraído

– Caso necessário, o armazenamento do DNA extraído deve ser realizado entre -30°C a -15°C;

– Ciclos de congelamento e descongelamento de DNA extraído devem ser evitados para prevenir a degradação do material genético;

– Usar sempre luvas descartáveis sem pó durante o manuseio do DNA para prevenir contaminação por nucleases. Mãos e partículas de poeira podem carrear bactérias e fungos, que são as fontes mais comuns desse tipo de contaminante;



– Manter os tubos contendo DNA fechados durante os procedimentos. Abrir um tubo de cada vez para realizar a adição da amostra à mistura de reação, para evitar que haja contaminação cruzada entre as amostras.

9. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O Kit IBMP Biomol Chagas é composto por um módulo de amplificação contendo:

- 01 tubo de Mistura de PCR contendo 1100 µL;
- 01 tubo de Oligomix contendo 110 µL;
- 01 tubo de Água RNase Free contendo 1800 µL;
- 01 tubo de Controle Interno (IAC) contendo 460 µL;
- 01 tubo de Controle Positivo (CP) contendo 120 µL;
- 01 tubo de Controle Negativo (CN) contendo 60 µL.

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 *DNA High Pure PCR Template Preparation (Roche Life Sciences)* e reagentes necessários para a extração;
- Micropipetas de precisão (0,5-10 µL, 10-100 µL e 100-1000 µL);
- Microtubos de 1,5 ou 2,0 mL, estéreis e livres de nucleases;
- Placa de PCR (96 poços);
- Ponteiras esterilizadas livres de RNases e DNases, com filtro (0,5-10 µL, 10-100 µL e 100-1000 µL);
- Recipientes para descarte de resíduos;
- Solução de guanidina (cloreto de guanidina 6 M contendo EDTA 0,2 M e com pH 8,0), quando aplicável;
- 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 10 ciclos de descongelamento, após os quais eventuais sobras de reagentes devem ser descartadas. As diluições dos componentes Controle Positivo e IAC 20x possuem uso único, sendo que eventuais sobras das diluições destes componentes devem ser descartadas.

Não é recomendado o congelamento e 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 DNA 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 talco 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 DNA 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 CP de 1.000 cópias/µL, um CP de 10 cópias/µL, um IAC 1x 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 e dos controles;
 - Calcular, conforme os volumes apresentados na Tabela 1, os volumes necessários para a realização da corrida;
- OBS:** Os volumes indicados não contemplam eventual perda durante processo de pipetagem.

Tabela 1. Receita para preparo da mistura de reação do Kit IBMP Biomol Chagas.

Componente	Volume para uma reação
Mistura de PCR	10 µL
Água RNase Free	4 µL
Oligomix	1 µL
Total	15 µL

- Em área física apropriada, identificar um microtubo para o 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 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 e transferi-la até a área de manipulação de amostras de ácidos nucleicos.

13.2. Preparo dos Controles Positivos

O CP é fornecido na concentração de 1.000 cópias/µL e deverá ser utilizado para o preparo de uma solução a 10 cópias/µL por meio de diluições seriadas 1:10, conforme descrito a seguir:

- Em área física apropriada para manipulação de ácidos nucleicos, identificar dois microtubos de 1,5 ou 2,0 mL como “CP 100 cópias/µL” e “CP 10 cópias/µL”;
- Homogeneizar gentilmente o tubo de CP 1.000 cópias/µL fornecido, por vórtex suave e centrifugar brevemente (*spin*);
- Adicionar aos microtubos, devidamente identificados, os componentes e volumes listados na Tabela 2;

Tabela 2. Instrução de preparo do CP 10 cópias/µL.

Diluição a ser preparada	Componentes e volumes
CP 100 cópias/µL*	45 µL de Água RNase Free + 5 µL CP 1.000 cópias/µL
CP 10 cópias/µL	45 µL de Água RNase Free + 5 µL CP 100 cópias/µL

* O CP 100 cópias/µL é utilizado apenas como etapa intermediária para a preparação do CP 10 cópias/µL e **não** deve ser aplicado diretamente na placa.

- Homogeneizar gentilmente por vórtex suave, pipetagem ou tamborilando e centrifugar brevemente (*spin*).

OBS: Manter as diluições em gelo até o momento de utilização. Eventuais sobras do CP 100 e 10 cópias/µL devem ser descartadas.

13.3. Preparo do Controle Interno de Amplificação 1x

O IAC é fornecido na concentração de 20x e deverá ser utilizado diretamente nas amostras antes da extração, de acordo com o item 8.2 desta Instrução de Uso. Além disso, o IAC 20x deverá ser utilizado para o preparo de uma solução com concentração 1x, conforme descrito a seguir:

- Em área física apropriada para manipulação de ácidos nucleicos, identificar um microtubo de 1,5 ou 2,0 mL como “IAC 1x”;
- Homogeneizar gentilmente o IAC 20x por vórtex suave e centrifugar brevemente (*spin*);



- Adicionar ao microtubo, devidamente identificado, os componentes e volumes listados na Tabela 3;

Tabela 3. Instrução de preparo do IAC 1x.

Componente	Volume
IAC 20x	1 µL
Água RNase Free	19 µL
Total	20 µL

- Homogeneizar gentilmente por vórtex suave, pipetagem ou tamborilando e centrifugar brevemente (*spin*).

OBS: Manter a diluição em gelo até o momento de utilização. Eventuais sobras do IAC 1x devem ser descartadas.

13.4. Adição de amostras e controles

- Em área física apropriada e seguindo o mapa da placa de reação, adicionar 5 µL de cada amostra de DNA extraído nos poços correspondentes na placa de reação;
- Adicionar 5 µL do Controle Positivo de 1000 cópias/µL no poço correspondente na placa de reação;
- Adicionar 5 µL do Controle Positivo de 10 cópias/µL no poço correspondente na placa de reação;
- Adicionar 5 µL do IAC 1x no poço correspondente na placa de reação;
- Adicionar 5 µL do Controle Negativo no poço correspondente na placa de reação;
- Sellar a placa de reação com adesivo óptico;
- Centrifugar a placa brevemente (*spin*).

13.5. Configurações de detecção e termociclagem

- Configurar o software do equipamento conforme o mapa da placa de reação estabelecido pelo usuário, identificando a posição de cada amostra, do controle negativo, dos controles positivos e o IAC;
- Configurar as fluorescências para cada canal conforme a Tabela 4;

Tabela 4. Alvos e fluorescências/canais a serem configurados para a análise.

Alvo	Fluoróforo repórter	Quencher
<i>T. cruzi</i>	FAM	NONE
IAC	HEX (VIC)	NONE

- Configurar os parâmetros de ciclagem da reação conforme a Tabela 5;

Tabela 5. Parâmetros de termociclagem para o Kit IBMP Biomol Chagas.

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Estágio 1	95	10 minutos	01
Estágio 2	95	15 segundos	45
	60*	60 segundos	

* Estágio para captura de fluorescência.

- Selecionar a referência passiva do equipamento como ROX;
- 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 6.

Tabela 6. Parâmetros analíticos a serem utilizados.

Equipamento	Alvo	Threshold	Baseline
7500 Real-Time PCR System	<i>T. cruzi</i>	0,2	AUTO
	IAC	0,02	AUTO

14.2. Interpretação dos resultados

- Para que uma corrida seja considerada válida, o CP de 1000 cópias/µL deve apresentar amplificação somente para o alvo *T. cruzi*, apresentando Ct ≤ 30 e o CP de 10 cópias/µL deve apresentar amplificação para o alvo *T. cruzi*, apresentando Ct ≤ 40;
- Para que uma corrida seja considerada válida, o poço de IAC 1x deve apresentar amplificação somente para o alvo IAC com Ct 17,8 < Ct ≤ 24,3;
- Para que uma corrida seja considerada válida, o Controle Negativo (CN) não deve apresentar amplificação para nenhum dos alvos (*T. cruzi* e IAC);
- Para que uma amostra seja considerada válida, o Ct do IAC não deve apresentar desvio de ± 1 Ct em relação à média do conjunto de amostras extraídas simultaneamente;
- Para que uma amostra seja considerada negativa, não deve apresentar amplificação do alvo *T. cruzi* e deve apresentar amplificação do alvo IAC com Ct 17,8 < Ct ≤ 24,3;
- Para que uma amostra seja considerada positiva, deve apresentar amplificação com curva de perfil típico para o alvo *T. cruzi*, com Ct 17 < Ct ≤ 45, e deve apresentar amplificação do alvo IAC com Ct 17,8 < Ct ≤ 24,3. Em testes com replicatas, a amostra será considerada positiva se ao menos uma apresentar amplificação.

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

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

Amostra		CPs	CN	IAC	Resultado
<i>T. cruzi</i>	IAC				
+	+	+	-	+	Detectável para <i>T. cruzi</i>
-	+	+	-	+	Não detectável para <i>T. cruzi</i>
+/-	-	+	-	+	Amostra inválida
+/-	+/-	+/-	+	+/-	Ensaio inválido
+/-	+/-	-	+/-	+/-	Ensaio inválido
+/-	+/-	+/-	+/-	-	Ensaio inválido

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

- Caso ocorra amplificação dos alvos *T. cruzi* ou IAC com Ct abaixo do limite inferior, esta amostra deverá ser diluída e novamente testada;
- Curvas atípicas ultrapassando o *Threshold*: ruídos podem resultar de artefatos de análise devido a leituras abaixo do *Baseline*. Nestes casos, recomenda-se a verificação de amplificação na aba “*Multicomponent plot*”. É indicado que as análises sejam realizadas utilizando o software *Design and Analysis*, versão 2.7.0 (ou superior).
- Caso uma amostra apresente Ct do IAC com desvio de ± 1 Ct em relação à média do conjunto de amostras extraídas simultaneamente, ela deve ser removida do conjunto e reprocessada. A média deve ser recalculada e o conjunto reavaliado.

15. SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES OU LIMITAÇÕES DO PRODUTO

- O Kit IBMP Biomol Chagas apresentou reação positiva na presença de DNA extraído de células de *Toxoplasma gondii* cultivadas *in vitro*, porém com resultados não lineares ao longo de diluições seriadas do mesmo DNA;
- 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 nestas Instruções de Uso);
- Amostras de DNA total extraído de sangue ou mistura de sangue total com solução de guanidina podem ser utilizadas com o Kit IBMP Biomol Chagas. O uso de outras matrizes biológicas não foi validado com o kit;
- Os resultados obtidos com o Kit IBMP Biomol Chagas devem ser interpretados em conjunto com informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais do paciente. Um resultado “Não detectável” não exclui a possibilidade de infecção por *Trypanosoma cruzi*.



16. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

16.1. Sensibilidade analítica

Para a determinação do limite mínimo de detecção (LoD), foram testadas oito diluições, de material genético sintético contendo as sequências do alvo *T. cruzi*.

O LoD95% do Kit IBMP Biomol Chagas, é de 12,7 cópias/reação (IC95% 5,01 a 75) para *Trypanosoma cruzi*.

16.2. Especificidade analítica

O kit não apresentou detecção cruzada frente a análise de amostras conhecidamente positivas para os seguintes patógenos: *Cyclospora cayetanensis*, *Eimeria acervulina*, *E. tenella*, *Leishmania amazonenses*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. infantum*, *Plasmodium falciparum* e *P. vivax*.

O kit apresentou detecção cruzada frente a análise de amostras conhecidamente positivas para *Toxoplasma gondii*.

16.3. Precisão

O Kit IBMP Biomol Chagas apresenta coeficientes de variação inferiores a 2,51% no teste de repetibilidade e coeficientes de variação inferiores a 1,67% no teste de reprodutibilidade, ambos conduzidos por três operadores em dois equipamentos distintos.

16.4. Desempenho diagnóstico

O desempenho diagnóstico do teste foi determinado através da análise de um painel de 50 amostras clínicas de sangue total previamente caracterizadas por qPCR *in house* para Chagas. Os resultados estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8. Desempenho diagnóstico do Kit IBMP Biomol Chagas comparada à qPCR *in house*.

qPCR		Método de referência		
		Detectável	Não detectável	TOTAL
Kit IBMP Biomol Chagas	Detectável	19	0	19
	Não detectável	0	31	31
	TOTAL	19	31	50

O teste apresenta sensibilidade diagnóstica de 100% e especificidade diagnóstica de 100% para detecção de *Trypanosoma cruzi* quando ao método molecular analiticamente compatível.

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 falsos-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 falsos-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 da 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 Chagas. Amostras coletadas e armazenadas em desacordo com o preconizado no item 8 desta Instrução de Uso podem gerar resultados falsos-negativos;

– Os parâmetros de desempenho apresentados nessa Instrução de Uso são aplicáveis para a análise de amostras de DNA total extraído de sangue ou mistura de sangue total com Solução de Guanidina. O uso DNA extraído de outras matrizes biológicas não foi validado para o Kit IBMP Biomol Chagas;

– O produto foi validado no equipamento citado no item 7 dessa Instrução de Uso.