

# Padronização de um teste "in house" para o diagnóstico molecular de tb pulmonar paucibacilar: resultados preliminares

*Standardization of an "in house" PCR-based test for the molecular diagnosis of paucibacillary tuberculosis: preliminary results*

Joseane da Fonseca-Costa<sup>1</sup>, Carla Conceição S. Loredó<sup>1</sup>, Thais Façanha Lotfi<sup>1</sup>, Anna Grazia Marsico<sup>1</sup>, Elizabeth Cortez-Herrera<sup>3</sup>, Fernanda Carvalho de Queiroz Mello,<sup>1</sup> Afranio L. Kritski<sup>1</sup>, Adalberto Rezende Santos<sup>2</sup>

## RESUMO

**Introdução:** a amplificação de ácido nucléico (AAN) através da técnica de reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR) pode ser útil para o diagnóstico da tuberculose. O objetivo deste trabalho foi padronizar um método molecular para o diagnóstico da TB pulmonar paucibacilar (TBP). **Material e métodos:** iniciadores específicos foram usados para amplificação da IS6110 diretamente de amostras clínicas (escarro espontâneo, escarro induzido e/ou lavado broncoalveolar) dos pacientes suspeitos de TBP. **Resultados:** os problemas encontrados durante a padronização foram observados em diferentes passos: i) extração do ADN: a) o uso da resina de sílica foi fundamental para aumentar a sensibilidade do protocolo da PCR. Entretanto, foi observado que, quando a amostra processada era submetida diretamente à amplificação, o uso da resina poderia ser omitido. ii) Condições de amplificação: a) a quantidade de amostra processada utilizada para a amplificação também é um importante fator para o sucesso da PCR e quando uma grande quantidade de amostra processada foi usada ou o tempo armazenagem da amostra foi superior a 30 dias, observou-se uma inibição parcial da amplificação; b) a adição do controle interno (CI) também foi avaliado em nosso sistema. Embora o uso do CI seja importante para monitoramento da inibição, a sua concentração é crítica para a sensibilidade da PCR devido à competição com o ADN alvo. **Conclusões:** estes resultados preliminares demonstram as dificuldades para o desenvolvimento de um teste eficiente de PCR "in house" para o diagnóstico da TBP.

## ABSTRACT

**Introduction:** the nucleic acid amplification (NAA) using *polymerase chain reaction* (PCR) can be useful for tuberculosis (TB). The aim of this paper was to standardize a method for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis (PTB). **Material and methods:** Specific primers were used for amplification of the IS6110 directly from sputum spontaneous, induced sputum and/or bronchoalveolar lavage of suspected PTB cases. The PCR results were correlated with bacilloscopy and culture. **Results:** the main problems during standardization were observed in different steps: i) handling samples: a) use of silica resin was fundamental for the higher sensitivity of PCR protocol. In Addition, it was noted that, when DNA was prompted amplified after extraction, this step could be omitted. ii) PCR-setup: a) the amount of DNA used for amplification represents other import factor in the success of PCR and as high is the amount of DNA higher could be the inhibition of the reaction; b) addition of an IC was another factor evaluated in our test. Although it's important to monitoring inhibition, concentration of this DNA is critic for PCR sensitivity, because of the competition with the target DNA. **Conclusions:** these preliminary results show the main problems to developing an effective "in house" PCR test for PTB diagnosis.

**Descritores:** tuberculose, PCR, diagnóstico.

**Keywords:** tuberculosis, PCR, diagnosis.

## Introdução

A tuberculose (TB) ainda é considerada um problema de saúde pública em todo o mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que entre 2000 e 2020, 1 bilhão de pessoas estarão infectadas pelo *M. tuberculosis*, cerca de 200 milhões desenvolverão a doença ativa e 35 milhões irão a óbito no mundo se não forem identificados novos métodos diagnósticos, novas vacinas, novos medicamentos e desenvolvidas atividades mais apropriadas para um controle eficaz do paciente com TB ativa e seus contatos<sup>(1)</sup>.

No Brasil, em 2001, a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) do Ministério da Saúde (MS) relatou 71.060 casos confirmados, sendo 33.250 (46,8%) destes oriundos da Região Sudeste. No Hospital Clementino Fraga Filho (HUCFF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, anualmente, são diagnosticados cerca de 250 pacientes com TB ativa, 180 com forma pulmonar (60 com baciloscopia positiva), dos quais 25% destes co-infectados pelo HIV<sup>(2)</sup>.

Desde a descoberta do *Mycobacterium tuberculosis*, o agente causador da TB, a busca de métodos diagnósticos eficientes e rápidos que possam ser empregados na descoberta da doença com intuito de quebrar a cadeia de transmissão tem sido uma constante. A detecção do agente etiológico através das técnicas bacteriológicas (baciloscopia e cultura para micobactérias) ainda constitui a forma mais segura de diagnosticar a TB. A baciloscopia é uma técnica bastante rápida e simples, pois exige apenas a microscopia direta do material fixado e corado em lâmina. Contudo, a impossibilidade de se distinguir entre as diferentes espécies de micobactérias e outros agentes como *Nocardia* sp, além da necessidade de uma carga entre 5.000 a 10.000 bactérias por mililitro de espécime para que seja considerada positiva, fazem da baciloscopia uma técnica de baixa eficiência, além de restringir a sua utilidade para amostras multibacilares<sup>(3)</sup>.

A cultura tem a capacidade de confirmar o diagnóstico em 80 a 85% dos casos de TB pulmonar, no entanto pode levar de 20 a 60 dias para um resultado final. Estas técnicas, embora muito úteis, apresentam

limitações, tais como baixa sensibilidade ou especificidade ou lentidão para se obter o diagnóstico final<sup>(4)</sup>. Em alguns casos de TB, como nas formas paucibacilares e nos pacientes infectados pelo HIV, a sensibilidade e a especificidade são fatores imprescindíveis para um diagnóstico correto e precoce favorecendo um tratamento efetivo e capaz de diminuir a morbi/mortalidade<sup>(5)</sup>.

Visto a necessidade de novos métodos diagnósticos para TB, o diagnóstico molecular vem se mostrando muito promissor, pois é um teste rápido (comparado com a cultura) e sensível<sup>(6)</sup>. A amplificação de ácidos nucleicos (AAN) através da técnica da reação de polimerização em cadeia (*polymerase chain reaction*, PCR) é um método molecular simples, que se baseia na amplificação de uma seqüência específica de um ácido desoxirribonucléico (ADN) alvo. Esta técnica reproduz a replicação do ADN *in vitro*, de um pequeno fragmento. Esse fragmento é amplificado em múltiplas cópias capazes de serem detectadas, por exemplo, em eletroforese em gel de agarose<sup>(7)</sup>.

Os sistemas chamados "in house" são aqueles desenvolvidos nos laboratórios de pesquisa onde cada grupo utiliza técnicas de extração, amplificação e detecção diferentes. Os sistemas "in house" vêm se mostrando muito promissores, pois o seu custo é relativamente baixo se comparados com os kits comerciais. Algumas seqüências do genoma das cepas do Complexo *M. tuberculosis* têm sido testadas nos sistemas "in house"<sup>(8-12)</sup>, dentre as quais, um sistema desenvolvido por Eisenach e cols.<sup>(8)</sup>, utiliza iniciadores específicos para uma pequena região dentro da seqüência de inserção denominada IS6110<sup>(13)</sup>, que é específica para o Complexo *M. tuberculosis*<sup>(8)</sup>. Tendo em vista que, este sistema utiliza ADN alvo que se apresenta em múltiplas cópias no genoma<sup>(14, 15)</sup>, muito provavelmente este é um sistema mais sensível e, portanto, com grande potencial para diagnóstico de TB através da AAN.

Este estudo tem como objetivo a padronização de um teste molecular "in house" em amostras respiratórias de pacientes com TB paucibacilar utilizando como alvo a seqüência de inserção IS6110.

- 
1. Unidade de Pesquisa em Tuberculose (UPT), Instituto de Doenças do Tórax (IDT) da Universidade Federal do Rio de Janeiro
  2. Laboratório de Hanseníase – FioCruz – Rio de Janeiro.
  3. Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) – FEPPS – Rio Grande do Sul.

**Endereço para correspondência:** Joseane da Fonseca Costa. Unidade de Pesquisa em Tuberculose – HUCFF – UFRJ. Av. Brigadeiro Trompowsky, s/nº – 4º andar – Ilha do Fundão - Rio de Janeiro – RJ – Brasil. CEP: 21941-590 Tel: (21) 2562-2446 – Fax: (21) 2550-6903 e-mail: joseane@hucff.ufrj.br

Artigo recebido para publicação no dia 05/12/2003 e aceito no dia 29/12/2003, após revisão.

## Materiais e métodos

### Diagnóstico bacteriológico da tuberculose

O material (escarro, escarro induzido ou lavado) foi recebido pela recepção de amostras e conduzido ao Laboratório de Micobacteriologia do Instituto de Doenças do Tórax/IDT/UFRJ, onde foram realizadas as baciloscopias após coloração pelo método de Ziehl-Nielsen (específico para micobactéria) e descontaminação pelo método da N-acetil-l-cisteína (NALC). O sedimento descontaminado foi ressuspenso em 2,5  $\mu$ L de água destilada estéril e aliqotado em 0,4  $\mu$ L para semeadura em Lowestein-Jensen (LJ). O restante foi congelado a -20° C e encaminhado ao laboratório de Genética e Biologia Molecular da Unidade de Pesquisa em TB (UPT) da Divisão de Pesquisa (DP) do IDT/UFRJ. A espécie da micobactéria foi analisada através de testes bioquímicos.

### Procedimentos de biologia molecular

As amostras clínicas respiratórias foram recebidas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da UPT/DP/IDT/UFRJ, identificadas, catalogadas e separadas em tubos cônicos (1,5 $\mu$ L). Foram realizadas alíquotas duplicadas de 500 $\mu$ L. Após a separação, as amostras foram armazenadas a -20° C.

### Extração de ADN das amostras clínicas

Após o descongelamento, 500 $\mu$ L de amostra foi submetida à centrifugação, por 10 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, ressuspenso em 50 $\mu$ L de NaOH 0,5N e mantido sob agitação constante por 10 min. Posteriormente, 100 $\mu$ L de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1M foram adicionados e a mistura foi centrifugada por 5 min. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado resultante foi ressuspenso em 100 $\mu$ L de TE-Triton 1% e mantido sob agitação constante por 10 min. Em seguida, a amostra foi submetida a três ciclos de choque térmico, consistindo de fervura e congelamento rápido. Ao final deste procedimento, a amostra foi mantida a 4° C por 12 horas e submetida à amplificação por PCR.

Para cada extração, um controle negativo da extração (sem ADN) que foi manipulado juntamente com os tubos que continham amostras clínicas para posterior controle de contaminação nesta fase.

### Amplificação do ADN micobacteriano por PCR

Foi realizada a amplificação do ADN micobacteriano por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para uma determinada região da seqüência de IS6110, presente nas diferentes espécies do complexo *M.*

*tuberculosis*, em um volume final de reação de 50 $\mu$ L contendo: tampão (20mM Tris-HCl e 50mM KCl), 200mM de dNTPs, 40 pmoles IS1 (sense), 40 pmoles IS2 (antisense), 3mM MgCl<sub>2</sub>, 1U Taq polimerase, 100pg de controle interno e 5 $\mu$ L de ADN extraído da amostra clínica.

Foram acrescentados um controle positivo, contendo ADN de *M. tuberculosis*, e um controle negativo da reação, contendo água, a cada série de amplificação.

Os tubos foram colocados em um termociclador (Theckne - Genius) e submetidos à amplificação com as seguintes condições de amplificação: trinta ciclos de 94° C por 2 minutos, 66° C por 2 minutos, 72° C por 2 minutos e um ciclo final de 4° C ¥.

### Detecção do produto amplificado

O produto amplificado foi detectado através de eletroforese em gel de agarose 1,5%. Posteriormente, o ADN foi corado com brometo de etídeo e transiluminado em luz ultravioleta para visualização e foto-documentação por técnico que desconhecia o diagnóstico da amostra analisada.

## Resultados

### Padronização

A padronização da técnica da PCR "in house", utilizando amostras respiratórias, foi realizada usando como técnica-referência a publicada por Rossetti e cols.<sup>(19)</sup>, isto é, as mudanças e variações realizadas na técnica de extração e amplificação foram baseadas na publicação acima.

### Processamento das amostras clínicas

As modificações introduzidas no processamento das amostras clínicas visaram, principalmente melhorar o rendimento da PCR e reduzir o custo. Durante a padronização, a resina, originalmente utilizada para a purificação do ADN, foi retirada do protocolo de extração, sem afetar o rendimento. No entanto, quando as amostras permaneceram estocadas por um determinado período de tempo (cerca de um mês ou mais), começaram a apresentar inibição. Após a re-introdução da resina no protocolo, o problema foi contornado. A tabela 1 sumariza as modificações realizadas em comparação à técnica desenvolvida por Rossetti e cols.<sup>(19)</sup>.

### Quantidade de amostra clínica a ser extraída

Cinco volumes diferentes (500  $\mu$ L, 250  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 50  $\mu$ L e 20  $\mu$ L) foram testados para extração das

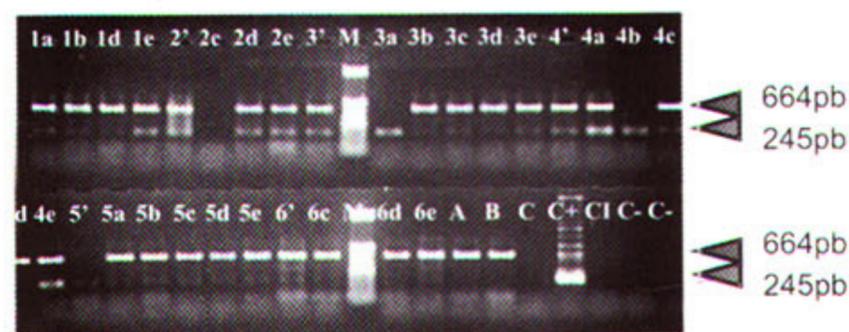
**Tabela 1 – Modificações realizadas no protocolo de extração de ADN.**

Procedimento	Técnica desenvolvida por Rossetti e cols. (18)	Técnica desenvolvida no Laboratório de Genética e Biologia Molecular - UPT
Quantidade de amostra bruta	500 µL	20 µL (*)
Lavagem	TE 1x	NaOH 0,5N NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1M
Tampão de lise	TE 1x	TE/Triton 1%
Lise física	Fervura (100º C)	Choque Térmico (10 min. 95º C – Gelo Seco/ Etanol 1 min.) 3x
Purificação	Resina	Resina
Lavagem	Etanol 70%	Etanol 70%
Tampão final	TE 1x	NaOH 8mM
Eluição	50º C – 10 min.	55º C – 30 min.

(\*) Somente para amostras multibacilares

amostras multibacilares a fim de determinar o menor volume necessário para a detecção de positividade em gel de agarose em comparação com a técnica descrita por Rossetti e cols. (1997). Observou-se que o limite máximo de redução no volume foi de 20% (redução de 500 µL para 20 µL), sem alterar, significativamente, a detecção do alvo após a realização da PCR em comparação com a técnica referência (Figura 1).

**Figura 1 – Padronização da quantidade de amostra clínica a ser extraída.**



1 e 2: Escarro Espontâneo; 3 e 4: Escarro Induzido; 5 e 6: Lavado Broncoalveolar. \*: 500 µL de amostra; a: 250 µL de amostra; b: 100 µL de amostra; c: 50 µL de amostra; d: 20 µL de amostra; e: Técnica Rossetti (1997) - 500 µL; A, B e C: Controle Negativo da Extração M) Marcador - 50 pb.

**Figura 2 – Padronização do Controle Interno.**



A) *M. tuberculosis* (MTB); B) MTB; C) MTB + CI (10 pg); D) MTB + CI (10 pg); E) CI (10 pg); F) CI (10 pg); G) MTB + CI (1,0 pg); H) MTB + CI (1,0 pg); I) CI (1,0 pg); J) CI (1,0 pg); L) MTB; M) MTB; N) MTB + CI (100 fg); O) MTB + CI (100 fg); P) CI (100 fg); Q) CI (100 fg); R) MTB + CI (10 fg); S) MTB + CI (10 fg); T) CI (10 fg); U) CI (10 fg); Ma) Marcador - 50 pb.

**Controle interno**

O Controle Interno (CI) foi titulado para utilização juntamente com a amostra clínica de modo a garantir a dupla amplificação (controle/alvo), sem que houvesse interferência no resultado final. A concentração ideal foi a de 100 fg do CI por reação (Figura 2).

**Condições de amplificação**

As modificações realizadas nas condições de amplificação encontram-se sumarizadas na tabela 2.

**Concentração da enzima Taq DNA polimerase**

Com os objetivos de otimizar o protocolo de amplificação e reduzir os custos, diferentes concentrações da enzima a ser utilizada para a amplificação foram testadas. Como resultado, a concentração de 2,5 U, proposta no protocolo original pôde ser reduzida para 1,0 U sem a perda da intensidade do sinal e mantendo a amplificação do controle interno sem alterações no resultado (Figura 3).

**Padronização da quantidade de amostra processada para realização da PCR**

No intuito de evitar problemas de inibição da reação da PCR, diferentes quantidades (10 µL, 5 µL e 2,5 µL) de amostras respiratórias processadas (paucibacilares e multibacilares) foram testadas (Figura 4). Observamos que a utilização de 10 mL de amostra processada resultou em inibição da amplificação enquanto que a utilização de 5 µL e 2,5 µL foi suficiente para a obtenção de um resultado positivo.

**Tabela 2** – Modificações realizadas nas condições de amplificação.

Procedimento	Técnica desenvolvida por Rossetti e cols. (18)	Técnica desenvolvida no Laboratório de Genética e Biologia Molecular - UPT
Quantidade de enzima	2,5 unidades	1,0 unidades
Quantidade de amostra processada	10 $\mu$ L	5,0 $\mu$ L
Temperatura de anelamento	68° C	66° C
Concentração de MgCl <sub>2</sub>	3,0 $\mu$ M	3,5 $\mu$ M

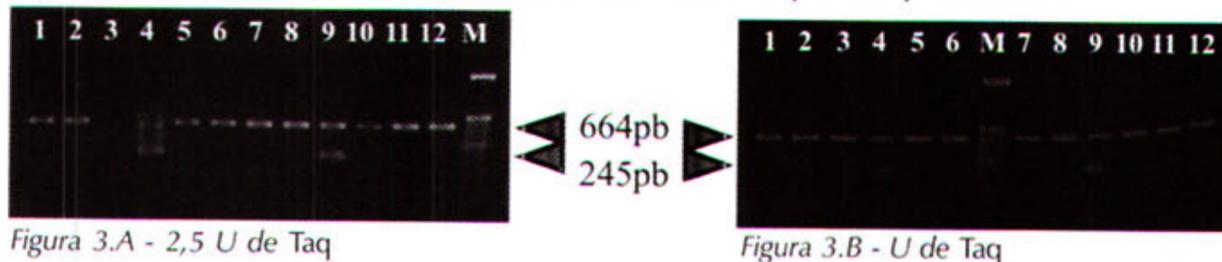
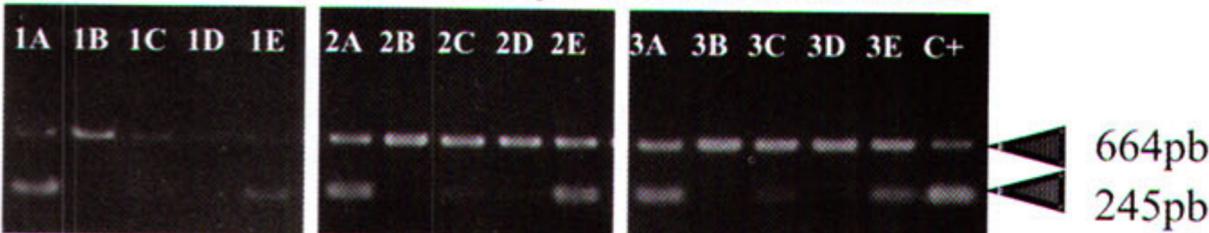
**Figura 3** – Padronização da concentração da enzima Taq DNA polimerase.

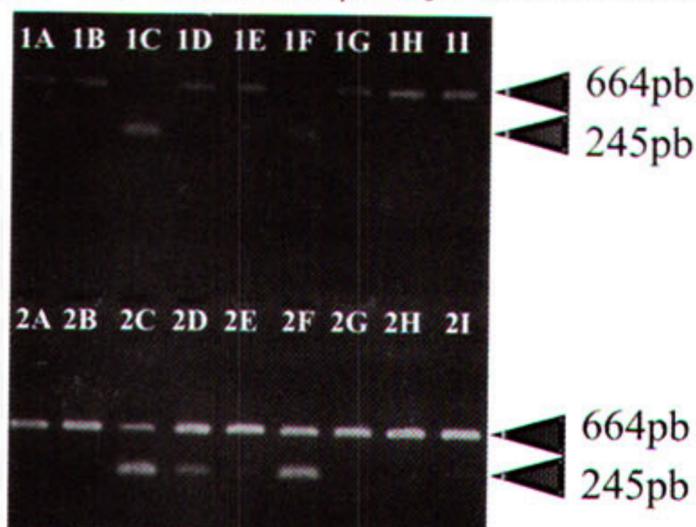
Figura 3.A - 2,5 U de Taq

Figura 3.B - U de Taq

1) Escarro Espontâneo (EE) – Paucibacilar; 2) EE – Paucibacilar; 3) EE – Paucibacilar; 4) EE – Multibacilar; 5) EE – Negativo; 5) Escarro Induzido (EI) – Paucibacilar; 6) EI – Paucibacilar; 7) EI – Paucibacilar; 8) EI – Multibacilar; 9) EI – Negativo; 10) Lavado Broncoalveolar (LBA) – Paucibacilar; 11) LBA – Paucibacilar; 12) LBA – Paucibacilar.

**Figura 4** – Padronização da concentração do material clínico extraído.

A) Escarro Espontâneo (EE) – Multibacilar; B) EE – Negativo; C) Escarro Induzido (EI) – Paucibacilar; D) EI – Paucibacilar; E) EI – Multibacilar; 1) 10 mL de amostra extraída; 2) 5 mL de amostra extraída; 3) 2,5 mL de amostra extraída; C+) MTB (Controle Positivo).

**Figura 5** – Uso do BSA na amplificação do alvo e do CI.

A) Escarro Espontâneo (EE) – Paucibacilar; B) EE – Paucibacilar; C) EE – Multibacilar; D) Escarro Induzido (EI) – Paucibacilar; E) EI – Paucibacilar; F) EI – Multibacilar; G) Lavado Broncoalveolar (LBA) – Paucibacilar; H) LBA – Paucibacilar; I) LBA – Multibacilar; 1) Amplificação usando BSA; 2) Amplificação sem BSA.

### Uso do BSA

Para verificar a possível influência do BSA (Soro Albumina Bovina) na eficiência de amplificação do alvo e do CI, 10 mg de BSA foram acrescentados à reação de amplificação. Observou-se que o BSA diminuía

visivelmente, a eficiência da amplificação (Figura 5).

### Temperatura de anelamento e concentração de MgCl<sub>2</sub>

A fim de verificarmos as condições de estrigência do sistema, as variáveis: temperatura de anelamento e concentração de MgCl<sub>2</sub> foram testadas individualmente. A temperatura de anelamento foi diminuída de 68°C para 66°C e testamos diferentes concentrações de MgCl<sub>2</sub> (1,5  $\mu$ M, 2,0  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 3,0  $\mu$ M e 3,5  $\mu$ M). A concentração sugerida é de 3,0  $\mu$ M. Após análise dos resultados, a redução da temperatura de

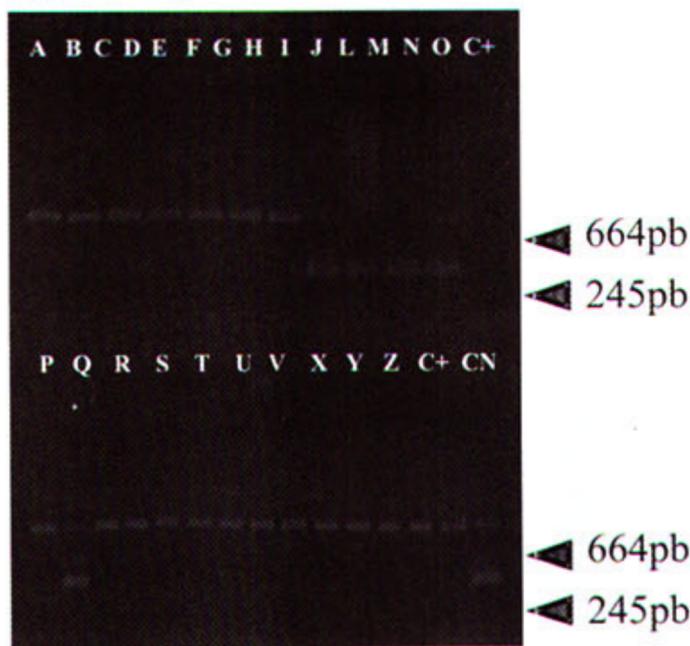
anelamento de 68°C para 66°C, acompanhada do aumento da concentração de MgCl<sub>2</sub> de 3,0  $\mu$ M para 3,5  $\mu$ M apresentaram um resultado mais satisfatório que nas condições anteriores.

### Especificidade dos oligonucleotídeos (iniciadores)

A IS6110 é um elemento de inserção que varia em número de cópias nos organismos pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*. Embora este alvo seja específico para o complexo *M. tuberculosis*, o teste de especificidade realizado com ADN de amostras micobacterianas oriundas da ATCC (American Type Culture Collection) mostrou uma nítida positividade da PCR na amostra de *M. flavescens* (Figura 6).

A fim de verificar a possível contaminação da cepa, um segundo teste foi feito utilizando ADN de *M. flavescens* proveniente de diferentes fontes (diferentes isolados clínicos e ATCC) para verificar se haveria amplificação da banda na mesma altura. Nenhum dos novos espécimes testados amplificou o alvo, com exceção da cepa utilizada no experimento anterior (Figura 7).

**Figura 6** – Teste da especificidade dos iniciadores para amplificação da seqüência IS6110.



A) *M. abscessus*; B) *M. flavescens*; C) *M. gordonae*; D) *M. chelonae*; E) *M. thermoresistibile*; F) *M. fortuitum*; G) *M. smegmatis*; H) *M. avium*; I) *M. scrofulaceum*; J) *M. trivialis*; L) *M. kansasii*; M) *M. nonchromogenicum*; N) *M. pulveris*; O) *M. kansasii* álbum; P) *M. rhodesiae*; Q) *M. xenopi*; R) *M. peregrinum*; S) *M. neoaurum*; T) *M. diernhoferi*; U) *M. malmoense*; V) *M. chitae*; X) *M. bovis* BCG; Y) *M. canettii*; Z) *M. tuberculosis* H37Rv; C+) *M. tuberculosis* MT 14323; CN) Controle Negativo.

**Figura 7** – Amplificação do ADN de *M. flavescens* provenientes de diferentes origens.



A) *M. flavescens* (CD5); B) *M. flavescens* (CD601); C) *M. flavescens* (CD640); D) *M. flavescens* (CD601); E) *M. flavescens* (CD31); F) *M. flavescens* (11); G) *M. flavescens* (13); H) *M. flavescens* (ATCC); C+) *M. tuberculosis* MT 14323; C-) Controle Negativo; M) Marcador – 123 pb.

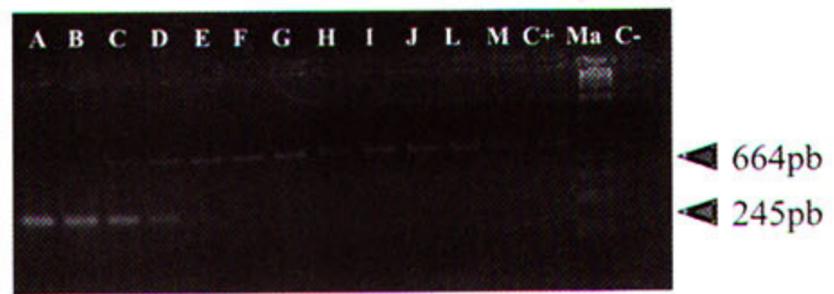
**Sensibilidade da PCR baseado na utilização de ADN purificado como alvo**

Para a determinação do limite de detecção visual do alvo foram realizadas diluições seriadas com um fator de diluição de 10, variando de 100 ng a 1,0 ag, a partir de ADN extraído de cultura. As diferentes concentrações foram submetidas a PCR e em seguida avaliadas através de eletroforese em gel de agarose. Neste experimento, o produto amplificado se mostrou visível, em gel de agarose, até a diluição de 10 pg (Figura 8).

**Eficácia da PCR “in house” na população estudada (nos diferentes tipos de amostras)**

A PCR “in house”, após a padronização foi testada em 171 amostras de pacientes paucibacilares. Observou-se que com o método de extração utilizado,

**Figura 8** – Sensibilidade de detecção da amplificação de IS6110.



A) 100 ng B) 10 ng; C) 1,0 ng; D) 100 pg; E) 10 pg; F) 1,0 pg; G) 100 fg; H) 10 fg; I) 1,0 fg; J) 100 ag; L) 10 ag; M) 1,0 ag; C+) *M. tuberculosis*; Ma) Marcador – 123 pb; C-) Controle Negativo.

apenas uma amostra mostrou-se inibida na reação de amplificação.

Na atual fase de padronização para o processamento das amostras, utilizando o diagnóstico clínico como padrão-ouro, a sensibilidade e especificidade do PCR “in house” foi de 25,9% e 100%, respectivamente. O PCR “in house” só detectou a presença de ADN do complexo *M. tuberculosis* em amostras onde houve o crescimento micobacteriano na escala acima de 2+. Analisando separadamente, as amostras de escarro induzido (S= 37,5%) apresentaram uma sensibilidade maior quando comparadas com as amostras de escarro espontâneo (S= 16,7%) e LBA (S= 0%).

**Discussão**

O diagnóstico molecular vem a cada dia se tornando uma importante ferramenta no combate às doenças infecciosas. Dentre os diversos testes moleculares, a PCR, visto sua alta especificidade, sensibilidade e rapidez, vem sendo a técnica de eleição na implementação de kits comerciais e/ou “in house” para detecção do ADN de espécies do complexo *M. tuberculosis* (7, 9, 15-22). Em países em desenvolvimento, onde a prevalência da TB é elevada e a co-infecção com o HIV é prevalente, é de suma importância o desenvolvimento de um teste que seja sensível para a TB paucibacilar, com um custo aceitável, de modo a ser implementado nos postos de saúde e Unidades Hospitalares de Referência. Para esta finalidade, o PCR “in house” mostra-se promissor. Até o presente momento, em nosso estudo, a padronização desta metodologia para utilização em amostras paucibacilares ainda não foi finalizada. Vários foram os problemas encontrados na padronização deste método diagnóstico molecular. Detalhes mínimos como qualidade da H<sub>2</sub>O em termos de pH, presença de íons, etc, devem ser considerados desde o preparo dos reagentes até a fase de amplificação. Além disto, observamos que o estabelecimento de um protocolo único para o processamento de diferentes amostras clínicas (paucibacilares, multibacilares, respiratórias ou não)

também foi limitante neste trabalho. As grandes variações em termos de acurácia (sensibilidade e especificidade) e eficiência nos trabalhos que envolvem a PCR "in house", além do alvo é a extração (processamento da amostra), trata-se de uma fase limitante quando se trabalha com amostras paucibacilares.

Além da baixa quantidade de bacilos, a parede da micobactéria também é um fator limitante pois a sua lise é difícil e exige um método mais drástico para que a mesma aconteça. Em nossa padronização da fase de extração, utilizamos uma mistura de protocolos baseados em métodos químicos (TE-Triton) e físicos (choque térmico) para a lise da parede micobacteriana. Este tipo de lise mostrou ser eficaz, não necessitando de uma fase adicional de purificação, podendo este produto ser usado diretamente para futuras amplificações. No entanto, observamos que o armazenamento deste material por algum tempo (um mês), resultou em perda da capacidade de amplificação e conseqüentemente na re-introdução do passo de purificação utilizando a resina. Este processo de purificação do ADN tem como objetivo a redução de fatores inibidores da reação de amplificação. A tentativa de excluir este passo prendeu-se ao fato do custo um pouco elevado, pois esta resina somente é adquirida em forma de kits (R\$ 300,00).

Verificamos que o problema da padronização do processamento das amostras ocorre basicamente depois da extração, quando estocamos por um período longo de tempo. A fim de melhorar a qualidade do ADN recuperado, em amostras paucibacilares, os testes serão repetidos sem a utilização da resina e serão mudadas condições de estocagem da amostra (estocagem a -70°C ou N<sub>2</sub> líquido).

#### **Quantidade de amostra clínica a ser extraída**

Com o objetivo de diminuirmos a quantidade de amostras utilizadas para a extração e conseqüentemente diminuirmos a concentração de inibidores presentes, a redução do volume de amostra extraída foi sugerida. Esta padronização foi feita inicialmente em amostras multibacilares obtendo resultado positivo em um volume de 20mL de amostra bruta processada. No entanto, em amostras paucibacilares, esta redução não foi possível pois a concentração do bacilo na amostra bruta é tão baixa que não permitiu esta redução. Nestas amostras torna-se necessário manter, nas reações, um volume de no mínimo de 500 mL de amostra.

#### **Controle interno**

O uso de um controle interno (CI) é essencial para o desenvolvimento de um teste molecular<sup>(24)</sup>. Os vários

fatores inibidores eventualmente presentes em diferentes tipos de amostras clínicas, freqüentemente interferem na fase de amplificação. Estes fatores podem atuar em diferentes componentes da mistura de reação e promoverem desde uma inibição parcial (diminuição do rendimento), até uma inibição total (ausência de amplificação). Em ambos os casos, o resultado fica comprometido e pode gerar a liberação de resultados falsos negativos. Uma vez que, para a amplificação do CI utilizado em nosso sistema "in house", utilizamos os mesmos iniciadores usados para a seqüência alvo, nosso sistema apresenta uma vantagem quando comparado a outros que utilizam seqüências diferentes para amplificação de seus CI.

A fim de evitar a competição do CI com o ADN alvo, na reação de amplificação, foi realizada uma titulação do CI, inicialmente padronizado para a concentração de uso de 10 pg por reação, concluímos que a concentração de 100fg foi a que melhor reproduziu a amplificação sem apresentar interferência (competição) com o ADN alvo.

#### **Concentração da enzima Taq DNA polimerase**

Uma das vantagens do desenvolvimento do sistema "in house" é o seu reduzido custo. Por ser um sistema desenvolvido no próprio laboratório, o preço final (por amostra) para todo o procedimento é menor se comparado com os sistemas comerciais.

Um dos componentes mais caros no desenvolvimento de um sistema de PCR é a enzima utilizada para a amplificação (Taq DNA polimerase). Portanto, a determinação da quantidade mínima necessária para reprodutibilidade da amplificação é de suma importância, pois resulta na diminuição do custo do teste sem alteração do resultado final. Realizamos experimentos utilizando diferentes amostras clínicas (multi e paucibacilar) e testamos duas diferentes quantidades da enzima e verificamos que a utilização de 1,0 U reproduziu os resultados obtidos com 2,5 U, o que representa uma redução de 60% da quantidade inicial utilizada por Rossetti e cols., 1997<sup>(19)</sup>.

#### **Padronização da quantidade de amostra processada para realização da PCR**

Além dos fatores conhecidamente envolvidos na inibição da reação de PCR<sup>(25)</sup>, a quantidade de amostra adicionada à mistura de reação também influencia na eficiência da amplificação<sup>(26)</sup>. Assim, experimentos para a determinação da menor quantidade de amostra capaz de manter o sinal de positividade sem causar inibição, foram realizados nas três diferentes amostras clínicas (EE, EI, LBA).

Os resultados demonstraram que no sistema "in house" a redução da quantidade de amostra extraída utilizada para o PCR foi fundamental para o melhor funcionamento do sistema. Os volumes de 2,5  $\mu$ L e 5  $\mu$ L de amostra previamente processada (redução de 75 e 50% do volume inicialmente utilizado) apresentaram melhores resultados se comparados com a quantidade de 10 mL de amostra processada, na qual demonstrou diminuição do rendimento na amplificação. Quando a técnica "in house" foi aplicada na amostras dos pacientes recrutados para o estudo, observou-se que somente uma amostra apresentou inibição.

### Uso do BSA

Algumas substâncias quando usadas concomitantemente na reação de amplificação apresentam um aumento na qualidade de amplificação<sup>(27)</sup>. O BSA é uma destas substâncias. No entanto, no sistema "in house", a introdução do mesmo no protocolo de amplificação não mostrou ser capaz de aumentar a sensibilidade da técnica. Uma das possibilidades de explicação para o efeito negativo apresentado pelo BSA no sistema em questão, prende-se ao fato do mesmo normalmente ser usado, principalmente, em sistemas onde os alvos são genes oriundos de células de mamíferos e não de bactérias, principalmente de um genoma rico em bases nitrogenadas GC. Outras substâncias deverão ser testadas a fim de melhorar a eficiência da amplificação.

### Temperatura de anelamento e concentração de MgCl<sub>2</sub>

A temperatura de anelamento é uma das etapas mais importante para a amplificação do ADN, pois é a partir dela que se é permitido a hibridação dos iniciadores no ADN alvo e a estringência do sistema<sup>(28)</sup>. A temperatura de anelamento baseia-se na TM (temperatura de dissociação) do iniciador, que é uma relação entre a quantidade de nucleotídeos GC e AT. Normalmente, a temperatura de anelamento ideal varia de 2 a 5°C abaixo da TM dos iniciadores.

Em nosso sistema, a TM média é de 65°C, e a utilizada por Rossetti e cols. é de 68°C<sup>(19)</sup>. Experimentos foram realizados comparando 68°C com 66°C e decidimos manter, para este sistema, a temperatura de anelamento de 66°C. Além da temperatura de anelamento, outro fator de suma importância na determinação da estringência do sistema é a concentração de magnésio. O magnésio tem função primordial na qualidade da amplificação, pois a atividade da Taq DNA polimerase (sensibilidade) e o anelamento dos iniciadores (especificidade) ao ADN alvo são

influenciados por ele. A combinação da temperatura de anelamento ideal com a concentração ideal de magnésio faz com que o sistema torne-se mais específico para o diagnóstico.

### Especificidade dos oligonucleotídeos (Iniciadores)

Vinte e quatro diferentes espécies de micobactérias, dentre as quais quatro eram membros pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* foram submetidas à amplificação a fim de verificar a especificidade do sistema para o complexo *M. tuberculosis*. Além das espécies pertencentes ao complexo, somente *M. flavescens* apresentou amplificação do alvo na mesma altura que as espécies pertencentes ao complexo.

No entanto, após repetirmos o experimento, acrescentando outras sete amostras de *M. flavescens*, de diferentes procedências (diferentes pacientes e ATCC), originárias de pacientes, constatamos que nenhuma delas apresentou amplificação, somente a espécie testada anteriormente, sugerindo uma contaminação da mesma com algum membro pertencente ao complexo *M. tuberculosis*.

As espécies sugeridas por Kent e cols.<sup>(29)</sup>, que em seu estudo demonstraram apresentar amplificação com iniciadores específicos para IS6110, em nosso estudo foram incluídos no teste de especificidade e nenhuma delas apresentou amplificação, corroborando os dados de Hellyer e cols.<sup>(30)</sup>, o qual, também não obteve amplificação. Estes dados demonstram o potencial deste alvo para o diagnóstico da TB.

### Eficácia do "in house"

O Limite de detecção visual, em gel de agarose, do sistema, nesta etapa de padronização, foi testado em uma diluição seriada de ADN de *M. tuberculosis* e estabelecido em 100pg. No entanto, a visualização em gel de agarose é limitada<sup>(31)</sup> e tendo em vista a baixa sensibilidade desta técnica após coloração do ADN com brometo de etídeo, a mesma não deve ser usada como critério único para liberação do resultado de diagnóstico molecular. O método de eleição para este fim é a hibridação, pois consegue detectar concentrações mínimas do produto amplificado, chegando a ser cerca de 100 vezes<sup>(32)</sup> mais sensível que o gel de agarose e capaz de eliminar resultados falso-negativos.

Além do aumento da sensibilidade, a hibridação é uma técnica extremamente específica, pois utiliza um outro oligonucleotídeo específico a uma região interna do produto amplificado que é flanqueado pelos iniciadores. Assim, um sinal positivo na hibridação distingue o real produto amplificado e possíveis

amplificações inespecíficas (falso positivo). Todos os kits comerciais moleculares para o diagnóstico de TB utilizam a hibridação como etapa final para o resultado, demonstrando a sua importância para um resultado seguro. Uma vez que por motivos técnicos não conseguimos padronizar os experimentos de hibridação, a determinação da real sensibilidade do sistema não pode ser alcançada. Esta fase será finalizada futuramente com o processamento das amostras.

### **Considerações finais sobre o sistema "in house"**

Várias são as dificuldades encontradas para a padronização de um método para diagnóstico molecular baseado em PCR. Após a escolha do alvo, além da padronização de todo o protocolo para amplificação, o qual, envolve condições de estricção (concentração de  $MgCl_2$ , e temperatura de anelamento), vários outros parâmetros precisam ser estabelecidos como: quantidade de enzima, número de ciclos, concentração dos dNTPs e a inclusão ou não de componentes adicionais (Triton ou DMSO) para melhorar a eficiência e/ou especificidade da reação, respectivamente. Adicionalmente, a padronização da etapa complementar constituída pela hibridação também envolve uma série de etapas e é primordial para a liberação de um laudo diagnóstico laboratorial da presença do material genético do agente etiológico em questão.

Em paralelo, a escolha do tipo de espécime clínico a ser utilizado e posterior protocolo para o processamento adequado da mesma é primordial para o sucesso da aplicação da técnica para diagnóstico.

Outro ponto fundamental é a procedência da amostra. As amostras paucibacilares caracterizam-se por uma baixa concentração bacilar existente na amostra e a fase de extração (processamento da amostra) parece ser limitante. Além da fase de extração, a fase de detecção também é limitante, pois sem o uso de uma técnica sensível o suficiente para que se possa detectar a mínima presença do material amplificado, não é possível realizar um teste diagnóstico eficiente.

Novos testes deverão ser realizados de modo a aumentar a eficiência da extração e da detecção para que este teste diagnóstico seja eficiente nas amostras respiratórias paucibacilares e posteriormente, uma análise de custo-efetividade deverá ser realizada a fim de avaliar a real aplicabilidade desta técnica em condições de rotina em escala piloto, como mais uma ferramenta para auxiliar o clínico no diagnóstico da TB.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

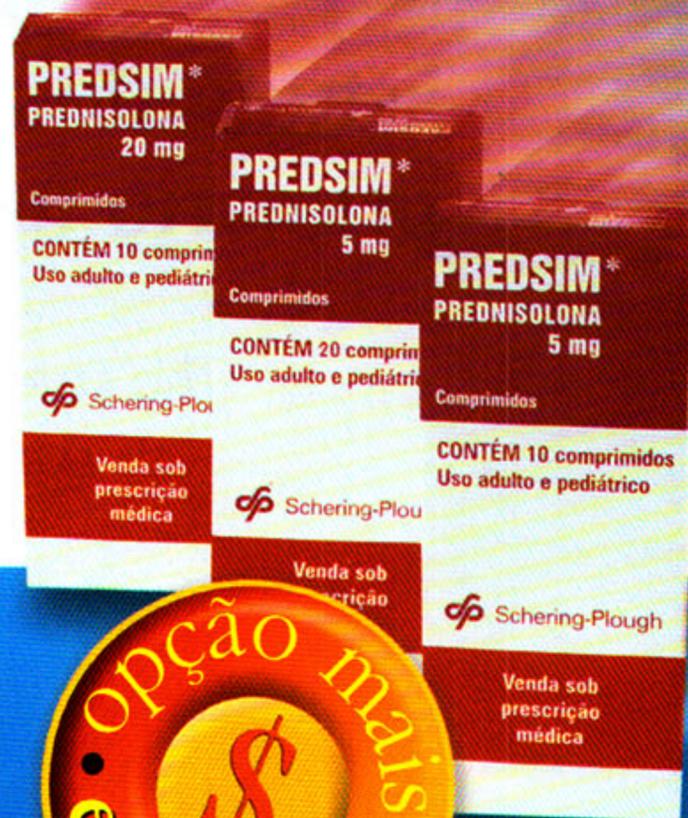
1. WHO. Tuberculosis - World Health Organization. World Health Organization 2000; Fact Sheet 104.
2. Kritski AL, Mello FCQ, Sales CLG, Gonçalves MLC, Anjos-Filho L, Pedra AM, et al. The Impact of the Activities of a Hospital Tuberculosis Control Program, in Rio de Janeiro, Brazil. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2000;161 (3).
3. WHO. World Health Organization. 1994.
4. Johnson S. A strategic plan for the elimination for tuberculosis in the United States. *MMWR* 1989; 70: 281-285.
5. Raviglione MC, Narain JP, Kochi A. HIV-associated tuberculosis in developing countries: clinical features, diagnosis and treatment. *Bulletin of the World Health Organization* 1992; 70 (4): 515-526.
6. Richeldi L, Barnini S, Saltini C. Molecular diagnosis of tuberculosis. *European Respiratory Journal* 1995; 8 (Suppl. 20): 689S-700S.
7. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-350.
8. Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Jack T C. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Infectious Diseases* 1990; 161: 977-981.
9. Lassence Ad, Lecossier D, Pierre C, Cadranel J, Stern M, Hance AJ. Detection of mycobacterial DNA in pleural fluid from patients with tuberculous pleurisy by means of the polymerase chain reaction: comparison of two protocols. *Thorax* 1992; 47: 265-269.
10. Brisson-Noël A, Gicquel B, Lecossier D, Levy-Frebault V, Nassif X, Hance AJ. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet* 1989; 2(8671): 1069-1071.
11. de Wit D, Steyn L, Shoemaker S, Sogin M. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; 28(11): 2437-2441.
12. Patel RJ, Fries JWU, Piessens WF, Wirth DF. Sequence analysis and amplification by polymerase chain reaction of a cloned DNA fragment for identification of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; 28(3): 513-518.
13. Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH, Gicquel B, et al. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Nucleic Acids Research* 1990; 18(1): 188.
14. Cave MD, Eisenach KD, McDermott PF, Bates JH. IS6110: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization

- in DNA fingerprinting. *Molecular and Cellular Probes* 1991; 5(1): 73-80.
15. Clarridge-III JE, Shawar RM, Shinnick TM, Plikaytis BB. Large-Scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine Mycobacteriology laboratory. *Journal of Clinical Methods* 1993; 31(8): 2049-2056.
  16. Khoo KK, Meadway J. Fiberoptic bronchoscopy in rapid diagnosis of sputum smear negative pulmonary tuberculosis. *Respiratory Medicine* 1989; 83(4): 335-338.
  17. Noordhoek GT, Kolk AH, Bjune G, Catty D, Dale JW, Fine PE, et al. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. *Journal of Clinical Microbiology* 1994; 32(2): 277-284.
  18. Pao CC, Yen TSB, You J-B, A J-SMA, Fiss EH, Chang C-H. Detection and Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; 28(9): 1877-1880.
  19. Rossetti MLR, Jardim SB, Rodrigues VdFS, Moura AR, Oliveira H, Zaha A. Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix. *Journal of Microbiological Methods* 1997; 28: 139-146.
  20. Reischl U, Lehn N, Wolf H, Naumann L. Clinical Evaluation of the Automated COBAS AMPLICOR MTB Assay for testing respiratory and Nonrespiratory specimens. *Journal of clinical Microbiology* 1998; 36(10): 2853-2860.
  21. Ausina V, Gamboa F, Gazapo E, Manterola JM, Lonca J, Matas L, et al. Evaluation of the semiautomated Abbott LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35(8): 1996-2002.
  22. Tortoli E, Tronci M, Tosi CP, Galli C, Lavinia F, Natili S, et al. Multicenter evaluation of two commercial amplification kits (Amplicor, Roche and LCx, Abbott) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary specimens. *Diagnostic Microbiology and Infection Disease* 1999; 33(3): 173-179.
  23. Bergmann JS, Woods GL. Clinical evaluation of the Roche Amplicor PCR *Mycobacterium tuberculosis* Test for detection of *M. tuberculosis* in respiratory specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 1996; 35(5): 1083-1085.
  24. deWit D, Wootton M, Allan B, Steyn L. Simple method for production of internal control DNA for *Mycobacterium tuberculosis* polymerase chain reaction assays. *Journal of Clinical Microbiology* 1993; 31(8): 2204-2207.
  25. Narayanan S. Considerations in the application of selected molecular biology techniques in the clinical laboratory: preanalytical and analytical issues. *Rinsho Byori* 1996; Suppl 103: 262-270.
  26. Erlich HA. PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplifications. New York: Stockton Press; 1989.
  27. Bachmann B, Luke W, Hunsmann G. Improvement of PCR amplified DNA sequencing with the aid of detergents. *Nucleic Acids Research* 1990; 18(5): 1309.
  28. Suggs SV, Wallace RB, Hirose T, Kawashima EH, Itakura K. Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78(11): 6613-6617.
  29. Kent L, McHugh TD, Billington O, Dale JW, Gillespie SH. Demonstration of homology between IS6110 of *Mycobacterium tuberculosis* and DNAs of other *Mycobacterium* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33(9): 2290-2293.
  30. Hellyer TJ, DesJardin LE, Assaf MK, Bates JH, Cave MD, Eisenach K. Specificity of IS6110-Based amplification assays for *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Clinical Microbiology* 1996; 34(11): 2843-2846.
  31. Kricka LJ. Nucleic Acid Detection Technologies - Labels, Strategies and Formats. *Clinical Chemistry* 1999; 45(4): 453-458.
  32. Lara FJS. Hibridação de ácidos Nucléicos. Ribeirão Preto: Holos Editora e Sociedade Brasileira de Genética; 2002. ■

# PredSim® prednisolona



Eficácia da prednisona com a  
segurança da prednisolona<sup>1</sup>



 Ação efetiva na Artrite  
e Lúpus



## Consenso Brasileiro de Asma 2002

"...Prednisolona é o corticóide mais  
utilizado no tratamento da asma e, por  
ter meia-vida intermediária, induz  
menos efeitos colaterais..."<sup>2</sup>

(adaptado do Consenso)

## Apresentações

 5mg  
10 e 20 comp.  20mg  
10 comp.

## Posologia média

5mg a  
60mg/dia  
comprimidos  
sulcados

Referência Bibliográfica: 1 - Drug Evaluation: Prednisolone. Englewood, Micromedex, Formato eletrônico, 2001. (International Healthcare Series for Windows, v. 108). 2 - Consenso Brasileiro no Manejo da Asma. J. Pneumol., v.28, p. 9-21, 2002 (supl. 1)

**PREDSIM® PREDNISOLONA. INDICAÇÕES:** PREDSIM é indicado para o tratamento de doenças endócrinas, osteoarticulares e osteomusculares, reumáticas, do colágeno, dermatológicas, alérgicas, oftálmicas, respiratórias, hematológicas, neoplásicas, e outras, que respondem à terapia com corticosteróides. A terapia com corticosteróide hormonal é complementar à terapia convencional. **CONTRA-INDICAÇÕES:** PREDSIM é contra-indicado em pacientes com infecções sistêmicas por fungos, hipersensibilidade a prednisolona ou a outros corticosteróides ou a qualquer componente de sua fórmula. **PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS:** Poderão ser necessários ajustes posológicos durante remissões ou exacerbações da doença em tratamento, resposta individual ao tratamento e exposição do paciente a situações de estresse emocional ou físico, tais como infecção grave, cirurgia ou traumatismo. Poderá ser necessário monitoramento por período de até um ano após o término de tratamento prolongado ou com doses altas de corticosteróides. Insuficiência secundária do córtex supra-renal, induzida por medicamento, pode ser resultante de retirada rápida do corticosteróide, podendo ser evitada mediante redução gradual da dose. O efeito dos corticosteróides é aumentado em pacientes com hipotireoidismo e cirrose. Recomenda-se uso cauteloso em pacientes com herpes simples oftálmico pelo risco de perfuração da córnea. É aconselhável cautela em relação a: cárie ulcerativa inespecífica, quando houver possibilidade de perfuração; abscesso ou outra infecção piogênica, diverticulite; anastomoses intestinais recentes; úlcera péptica; corticosteróides aumentam a excreção de cálcio. Considerar a possibilidade de dieta hipossódica e suplementação de potássio, quando os corticosteróides forem utilizados. Os pacientes não deverão ser vacinados contra varicela durante terapia com corticosteróides. A corticoterapia pode alterar a mobilidade e o número de espermatozoides. **INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS:** O uso concomitante de fenobarbital, fenitoina, rifampicina ou etidrina pode aumentar o metabolismo dos corticosteróides, reduzindo seus efeitos terapêuticos. O uso concomitante de corticosteróides com diuréticos depletora de potássio pode intensificar a hipocalcemia. O uso dos corticosteróides com glicosídeos cardíacos pode aumentar a possibilidade de arritmias ou intoxicação digitalica associada à hipocalcemia. Os corticosteróides podem potencializar a depleção de potássio causada pela antitumorina B. Os efeitos dos anti-inflamatórios não-esteróides ou do álcool, somados aos dos glicocorticóides PREDSIM têm sido do mesmo tipo das relatadas para outros corticosteróides e normalmente podem ser revertidas ou minimizadas com a redução da dose, sendo isto preferível à interrupção do tratamento com o fármaco. Estas incluem: Alterações hidroeletrólíticas; alterações osteoarticulares e osteomusculares; alterações gastrointestinais; alterações dermatológicas; alterações neurológicas; alterações endócrinas; alterações oftálmicas; alterações metabólicas; alterações psiquiátricas. **POSOLOGIA:** Adultos. A dose inicial de PREDSIM para adultos pode variar de 5 a 60 mg diários, dependendo da doença em tratamento. Crianças. A dose pediátrica inicial pode variar de 0,14 a 2 mg/kg de peso por dia, ou de 4 a 60 mg por metro quadrado de superfície corporal por dia, administrados de 1 a 4 vezes por dia. Posologias para recém-nascidos e crianças devem ser orientadas segundo as mesmas considerações feitas para adultos, ao invés de se adotar rigidez estrita aos índices para idade ou peso corporal. Reg. MS nº 1.0093.0207. VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA.

\*Para mais detalhes antes de sua prescrição, favor ler a bula completa do medicamento. Documentação à disposição da classe médica: diretoria médica - biblioteca - caixa postal 18388 - Cep 04626-970 - São Paulo - SP\*



 Schering-Plough  
você pode confiar

Home Page: [www.schering-plough.com.br](http://www.schering-plough.com.br) / e-mail: [atendimento@schering-plough.com.br](mailto:atendimento@schering-plough.com.br)  
Rua Antonio das Chagas, 1.623 - 2º andar - CEP 04714-002 - São Paulo - SP

Central  
de Atendimento  
  
0800-117788  
Schering-Plough  
[www.schering-plough.com.br](http://www.schering-plough.com.br)  
[atendimento@schering-plough.com.br](mailto:atendimento@schering-plough.com.br)  
Cx. Postal 18388 • CEP 04626-970  
Fax 0800-167789