

Identificação por PCR-multiplex de espécies de *Mycobacterium*

Identification of *Mycobacterium* species by multiplex PCR assay

Rosemeri Maurici da Silva

Médica, Professora do Departamento de Clínica Médica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brasil

Susie Coutinho Liedke, Farmacêutica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

Luciana Daikuara, Estudante, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

Simone Gonçalves Senna, Bióloga, Pesquisadora, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

Christine Lourenço Nogueira, Farmacêutica, Pesquisadora, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

Leticia Muraro Wildner, Farmacêutica, Pesquisadora, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

Maria Luiza Bazzo, Farmacêutica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

Acceda a este artículo en
siicsalud

Código Respuesta Rápida
(Quick Response Code, QR)



www.siicsalud.com/dato/128772

Recepción: 30/1/2013 - Aprobación: 29/8/2014
Primera edición, www.siicasalud.com: 29/9/2014

Enviar correspondencia a: Rosemeri Maurici da Silva, Universidade Federal de Santa Catarina, 88.040.970, Florianópolis, Brasil
rosemaurici@gmail.com



Especialidades médicas relacionadas,
producción bibliográfica y referencias
profesionales de las autoras.

Abstract

Multiplex polymerase chain reaction (PCR) is a potentially useful diagnostic tool for fast and accurate identification of clinically relevant non-tuberculous mycobacteria (NTM) and *Mycobacterium tuberculosis* (TB). This multiplex system is able to identify the 32-kDa antigen present in most *Mycobacterium* genus species, the IS6110 insertion sequence belonging to the TB complex and the species-specific sequence of the *mtp40* gene in TB. One hundred and eight randomly selected sputum and extra-pulmonary samples from the Reference Center Laboratory for Public Health in the State of Santa Catarina (LACEN/SC) were processed and analyzed at the Laboratory of Molecular Biology and Mycobacteria (LMBM), Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, between January and June 2011, representing 30% of the positive samples received annually at LACEN/SC. Of the 108 isolates, 80% were identified as TB and 20% as NTM. The multiplex PCR results were compared with PCR-restriction enzyme analysis of the *hsp65* gene (PRA-hsp65), demonstrating 100% concordance (Kappa index 1). Multiplex PCR is a superior tool to differentiate between TB and NTM when used in combination with biochemical tests and culture differentiate between TB and NTM. In addition, it is more cost effective than other molecular biological assays and has been used as an epidemiological tool in strain classification and in distinguishing TB from NTM. Multiplex PCR is fast, sensitive and specific in mycobacteria identification and is, therefore, useful for routine clinical laboratory assays.

Key words: tuberculosis, multiplex PCR, molecular biology

Resumo

Reação em Cadeia da (La reacción en cadena de la) Polimerase Multiplex (PCR- multiplex) é um (es un) método diagnóstico potencialmente útil para identificação rápida e acurada (y exacta) de *Mycobacterium tuberculosis* (TB) e de micobactérias não-tuberculosas (MNT) clinicamente relevantes. Este sistema multi-iniciadores (multiprimers) é capaz de identificar o (el) antígeno alfa de 32-kDa presente na (en la) maioria das (de las) espécies do gênero *Mycobacterium*, a sequência de inserção IS6110 pertencente ao complexo (al complejo) TB e as sequências espécie-específicas do (del) gene *mtp40* de *Mycobacterium tuberculosis*. Cento e oito amostras (Ciento ocho muestras) (escarro [esputo] e extra-pulmonares) oriundas do Setor de Tuberculose do Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina (LACEN/SC) foram processadas e analisadas no Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias (LBMM) da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, entre janeiro e junho de 2011, representando 30% das amostras (de las muestras) positivas/ano no (al año en el) LACEN/SC. Dos (Entre los) 108 isolados (aislamientos), 80% foram identificados como TB e 20% como MNT. Os resultados da PCR multiplex foram comparados com os resultados do PRA-hsp65 (PCR do gene *hsp65* seguida por análise de restrição enzimática) e demonstraram 100% de concordância (Índice de concordância kappa 1). A PCR multiplex é uma ferramenta (es una herramienta) superior para diferenciar TB de MNT quando utilizada em (cuando se utiliza en) combinação com testes (análisis) bioquímicos e cultura. Além disso (Además), apresenta melhor custo efetividade (presenta mejor costo-eficacia) do que outros ensaios moleculares e tem sido (y ha sido) utilizada como uma ferramenta para estudos epidemiológicos para classificação e distinção entre TB e MNT. PCR multiplex é um método rápido, sensível e específico para identificação de micobactérias e útil na rotina (y de utilidad en la rutina) de laboratórios clínicos.

Palavras chave: tuberculose, PCR multiplex, biologia molecular

Introdução e objetivos

A (La) identificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e das (y de las) micobactérias não-tuberculosas (MNT) é importante para epidemiologia, controle das doenças e da (de las enfermedades y de la) efetividade do tratamento.^{1,2} O controle da tuberculose (TB) requer a (requiere la) identificação, o tratamento e as (y las) in-

formações epidemiológicas sobre o controle da infecção, assim como as (así como las) infecções com MNT tem sido associadas com uma variedade de problemas pulmonares, em linfonodos, na pele, tecidos moles (en la piel, tejidos blandos), esqueleto, infecções disseminadas e surtos nosocomiais (brotes hospitalarios) relacionados com dificuldades diagnósticas, identificação e tratamen-

to. Devido ao fato (*al hecho*) de que a maioria das MNT é intrinsecamente resistente aos (*a los*) tuberculostáticos de primeira linha, a identificação das espécies é importante para o controle das infecções e efetividade do tratamento.³⁻⁵ Em Santa Catarina, a incidência estimada é de (es de) 1 500 novos casos de TB por ano (*por año*); o Estado está entre os com (*entre aquellos con*) menor incidência no (*en el*) país (27/100 000 habitantes). Entretanto (*Sin embargo*), alguns municípios apresentam incidência igual ou maior à do (*o más elevada que la de*) Brasil (45/100 000 habitantes), por exemplo, Itajaí e Joinville, com 84.7 casos por 100 000 habitantes, e 46.2 casos por 100 000 habitantes, respectivamente, e a incidência de MNT é de 1.2% dos casos por ano, e têm sido identificadas principalmente de sítios extra-pulmonares.^{6,7}

Os métodos convencionais para identificação de micobactérias envolvem o (*involucran el*) cultivo em meios (*en medios*) sólidos ou líquidos, seguido da observação do crescimento e da (*y de la*) produção de pigmentos. Além disso, testes (*Además, análisis*) bioquímicos como a produção de niacina, redução de nitrato e o teste da catalase (*de la catalasa*) termo estável, também são necessários.⁸

Reações de PCR multiplex oferecem identificação rápida e acurada das (*y exacta de las*) espécies. Esta técnica, sensível e específica, está baseada na (*basada en la*) amplificação de sequências hábeis a (*con capacidad para*) diferenciar o complexo *Mycobacterium tuberculosis* e as MNT.⁹⁻¹¹ A proteína espécie-específica mtp40 pode ser utilizada no diagnóstico da TB porque não está presente em *Mycobacterium bovis* BCG, a sequência de inserção IS6110 está presente em várias cópias dispersas no genoma dos membros (*de los miembros*) do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e o gene que codifica o antígeno alfa de 32-kDa está presente em todas as micobactérias, sendo alvo (*y es blanco*) potencial para triagem diagnóstica molecular.¹²⁻¹⁴

O presente estudo apresenta um teste de PCR multiplex útil para discriminar bactérias do complexo *M. tuberculosis*, *M. tuberculosis* e MNT no (*en el*) diagnóstico molecular de rotina.

Métodos

Isolados (Aislamientos) clínicos

Cento e oito isolados (*Ciento ocho aislamientos*) clínicos selecionados randomicamente entre amostras de escarro e (*muestras de esputo y*) extra-pulmonares do Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Santa Catarina (LACEN/SC) foram processados e analisados no Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias (LBMM) da Universidade Federal de Santa Catarina. Esses isolados obtidos (*obtenidos*) entre janeiro e junho de 2011 representam 30% das amostras positivas recebidas anualmente pelo (*por el*) LACEN/SC.

Baciloscopia e cultura (cultivo)

As baciloscopias foram realizadas no Setor de Tuberculose do LACEN/SC. Cada amostra clínica foi cultivada em meio de (*en medio de cultivo*) Ogawa-Kudoh, incubada a 37°C por 4 semanas, seguindo rigorosamente as instruções do fabricante do meio (Laborclin®-Brazil).

Cepas de referência

Para as reações (*las reacciones*) de padronização foram utilizados DNA obtidos das cepas referência *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* ATCC00020, *M. avium* ATCC25398, *M. fortuitum* ATCC6841, *M. goodii* ATCC00161, *M. kansasii* ATCC12498 e (*y*) *M. bovis* BCG ATCC19274.

Extração de DNA

Os (*Los*) DNA das culturas (*de los cultivos*) de micobactérias foram extraídos utilizando a metodologia CTAB descrita por Van Soolingen e colaboradores.¹⁵

PCR Multiplex

As reações (50 µl) foram feitas (*han sido realizadas*) com a mistura (*la mezcla*) de 50-100 ng de DNA, 2.5 mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 1U de Taq DNA polymerase recombinant (Invitrogen®, USA) e 25 pmol de cada primer: PT1 ePT2 para amplificar um produto de 395 pares de bases (pb) da sequência espécie-específica mtp40; IS5 e IS6 para amplificar 984 pb do elemento de inserção IS6110; MT1 e MT2 para amplificar 506 pb do gene que codifica o antígeno alfa de 32kDa (Tabela 1). Foram adotadas as (*Se adoptaron las*) seguintes condições para as reações de PCR multiplex: 94°C por 1 minuto, pareamento a 71°C por 90 segundos, e extensão a 72°C por 2 minutos em 30 ciclos e extensão final a 72°C por 10 minutos.¹¹ Os produtos amplificados foram revelados em (*se revelaron en*) gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio e visualizados com luz ultravioleta.

Tabela 1. Sequências dos iniciadores utilizados no presente estudo.

Região alvo	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Tamanho (pb)
mtp40	CGGCAACGGCCGTCGGTGG CCCCCACGGCACCGCCGGG	395
32-kDa	TTCCTGACCAGCGAGCTGCCG CCCCAGTACTCCAGCTGTGC	506
IS6110	CGGAGACGGTGCGTAAGTGG GATGGACCGCCAGGGCTTGC	984

Resultados

Do (*Del*) total de 108 isolados, 80% foram identificados como *Mycobacterium tuberculosis* e 20% como MNT. Os resultados da PCR multiplex (Figura 1) foram comparados com os resultados do método PRA-*hsp65* (PCR - seguida de restrição enzimática)¹⁶ e apresentaram 100% de concordância (Tabela 2) (índice de concordância kappa 1). A PCR multiplex é uma ferramenta (*constituye una herramienta*) excelente para diferenciação do complexo *M. tuberculosis* das MNT, especialmente se utilizada em associação com a cultura e os testes (*el cultivo y los análisis*) bioquímicos. Além disso (*Además*), a PCR multiplex apresenta maior custo efetividade (*mayor rentabilidad*) se comparada com outros testes moleculares, e tem sido empregada (*y ha sido utilizada*) como uma ferramenta epidemiológica para classificação de estirpes e (*cepas y*) distinção entre o complexo *M. tuberculosis* e as MNT.

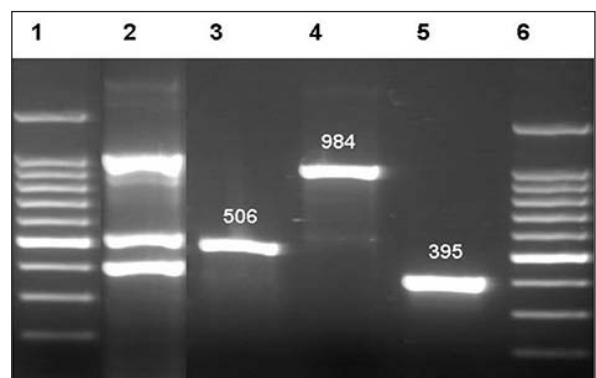


Figura 1. Produtos da amplificação da PCR multiplex em gel de agarose a 1%. Canaletas 1 e 6: marcador de tamanho molecular (*ladder*) 100 pb; Canaletas 2: *M. tuberculosis* H37Rv; Canaletas 3: sequência de 32-kDa Canaletas 4: Sequência IS6110 e Canaletas 5: gene *mtp40*.

Tabela 2. Comparação entre análise fenotípica e molecular.

Análise molecular		Análise fenotípica					
PCR multiplex (n)	PRA-hsp65 (n)	Cultura	Crescimento	Pigmentação	PNB	Niacina	Nitrato
<i>M. tuberculosis</i> (87)	<i>M. tuberculosis</i>	+	lento	-	-	+	+
MNT (21)	<i>M. avium</i> (10)	+	lento	-	+	n/r	n/r
	<i>M. intracellulare</i> (1)	+	lento	-	+	n/r	n/r
	<i>M. kansasii</i> (4)	+	lento	-	+	n/r	n/r
	<i>M. abscessus</i> (1)	+	rápido	-	+	n/r	n/r
	<i>M. terrae</i> (2)	+	lento	-	+	n/r	n/r
	<i>M. bohemicum</i> (1)	+	lento	+	+	n/r	n/r
	<i>M. holsaticum</i> (1)	+	rápido	-	+	n/r	n/r
	<i>M. nonchromogenicum</i> (1)	+	lento	-	+	n/r	n/r
Total 108							

(-) negativo; (+) positivo; (n/r) não realizado

Discussão

O gênero *Mycobacterium* é representado por uma ampla gama de espécies, que formam um grupo heterogêneo em termos de ocorrência em (*en términos de*) variedade de materiais clínicos, complexos fenotípicos, dados (*datos*) genéticos e associação com doenças (*con enfermedades*).¹⁷ Atualmente, a identificação convencional das micobactérias isoladas em cultura é obtida por meio (*se obtiene por medio*) de métodos fenotípicos (bioquímicos) e aspectos relativos ao crescimento no meio (*al crecimiento en el medio de cultivo*) (tempo de crescimento e pigmentação); pelas (*por las*) dificuldades desses testes (*de estos análisis*), poucas micobactérias são identificadas desta forma.¹⁸ A determinação dos achados (*de los hallazgos*) fenotípicos é demorada (*requiere más tiempo*), extremamente trabalhosa, e dificilmente assimilada como um método diagnóstico preciso uma vez que nem sempre é (*no siempre es*) reprodutível.¹⁹ Dessa forma, esforços para se obter um (*los esfuerzos para lograr un*) método de identificação molecular tem sido empreendidos (*han sido realizados*), a PCR multiplex envolvendo três (*involucrando tres*) produtos é um método altamente sensível, específico e permite identificar e diferenciar os principais (*los principales*) grupos. Este sistema foi baseado na (*tuvo como base la*) amplificação simultânea do gene espécie-específica *mtp40*, sequência de inserção IS6110, e o gene do antígeno alfa *de32-kDa*, em um único passo. *M. tuberculosis* pode ser identificado e diferenciado de *M. bovis* e de outras micobactérias não-tuberculosas. O sistema multiplex não deixaria (*no dejaría*) de detectar a micobactéria em uma possível ausência da IS6110 em algumas estirpes, uma vez que fragmentos de DNA corres-

pondentes a amplificação do gene espécie-específica *mtp40* e do gene do antígeno alfa de 32-kDa ainda estariam (*aún estarían*) presentes. PCR Multiplex tem sido aplicada no (*en el*) laboratório de biologia molecular e micobactérias como triagem para identificação e auxílio ao (*al*) diagnóstico convencional. Testes de PCR Multiplex são tecnicamente

mais (*son técnicamente más*) exigentes do que os (*que los*) protocolos das PCR convencionais. Esses problemas técnicos incluem competição e ou (*incluyen competencia u*) homologia entre os iniciadores escolhidos (*elegidos*), temperaturas de pareamento e concentração dos iniciadores (*de los primers*). Embora diferentes PCR multiplex tenham sido descritas para diferenciação de complexo *M. avium* e *M. intracellulare*,²⁰ complexo *M. tuberculosis* e *M. bovis*,²¹ complexo *M. tuberculosis* e complexo *M. avium*.²² Os isolados identificados como MNT foram identificados com a técnica PRA-hsp65. Os resultados do presente estudo mostraram a capacidade da ferramenta PCR multiplex para diferenciar espécies de *M. tuberculosis* de outras espécies de micobactérias, entretanto deve ser associada com a cultura e provas (*y análisis*) bioquímicas para obter (*lograr*) melhores resultados. A PCR Multiplex possibilita a amplificação simultânea de dois ou mais loci gênicos em uma (*dos os más loci génicos en una*) única reação.

Infelizmente a padronização de uma reação PCR multiplex é desafiadora (*es desafiante*) porque há (*existe la*) necessidade de empregar (*utilizar*) diferentes pares de iniciadores para cada locus que será amplificado, cada um requerendo (*cada uno de ellos requiere*) diferentes condições de amplificação e de stringência (*y de astringencia*). A sensibilidade e a (*y la*) especificidade do método dependem da seleção da sequência alvo, e quando a (*y cuando la*) PCR multiplex é utilizada como auxiliar nas triagens de rotina do (*en las selecciones de rutina del*) LBMM/UFSC, tem se mostrado útil para diferenciar *M. tuberculosis* das MNT. A PCR multiplex *in house* que padronizamos é uma ferramenta com relação custo efetividade superior a outros testes moleculares.

Copyright © Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC), 2014
www.siic.salud.com

Las autoras no manifiestan conflictos de interés.

Lista de abreviaturas y siglas

MNT, micobacterias no tuberculosis; TB, tuberculosis; LACEN/SC, Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Santa Catarina; LBMM, Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias; pb, pares de bases.

Cómo citar este artículo/Como citar este artigo

Maurici da Silva R, Coutinho Liedke S, Daikuara L, Gonçalves Senna S, Lourenço Nogueira C, Muraro Wildner L, Bazzo ML. Identificação por PCR-multiplex de espécies de *Mycobacterium*. Salud i Ciencia 20(7):698-701, Ago 2014.

How to cite this article

Maurici da Silva R, Coutinho Liedke S, Daikuara L, Gonçalves Senna S, Lourenço Nogueira C, Muraro Wildner L, Bazzo ML. Identification of *Mycobacterium* species by multiplex PCR assay. Salud i Ciencia 20(7):698-701, Ago 2014.

Autoevaluación del artículo

La identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y de las micobacterias no tuberculosas resulta fundamental con fines epidemiológicos y para la efectividad del tratamiento.

¿Cuál es la razón para identificar las especies de micobacterias no tuberculosas en pacientes infectados?

A, Los motivos son fundamentalmente académicos; B, Para optimizar el conocimiento bacteriológico; C, Estos gérmenes son en general resistentes a tuberculostáticos, por lo cual se necesita su identificación; D, Todas son correctas; E, Ninguna es correcta.

Verifique su respuesta en www.siicsalud.com/dato/evaluaciones.php/128772

Bibliografía

- Saiman L. The mycobacteriology of non-tuberculous mycobacteria. *Paediatr Respir Rev* 5(Suppl A):S221-S223, 2004.
- World Health Organization. Implementing the Stop TB strategy. A handbook for national tuberculosis control programmes. WHO Report 2008. Geneva: World Health Organization, 2008.
- Sampaio JL, Chimara E, Ferrazoli L, Da Silva Telles MA, Del Guercio VM, Jerico ZV, et al. Application of four molecular typing methods for analysis of *Mycobacterium fortuitum* group strains causing post-mammoplasty infections. *Clin Microbiol Infect* 12(2):142-149, 2006.
- De Groote MA, Huitt G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. *Clin Infect Dis* 42(12):1756-1763, 2006.
- Duarte RS, Lourenço MCS, Fonseca LS, Leão SC, Amorim ELT, Rocha ILL, et al. Epidemic of postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. *J Clin Microbiol* 47(7):2149-2155, 2009.
- Diretoria de Vigilância Epidemiológica (DIVE) [Homepage on the Internet]. Setor de Tuberculose. [cited 2011 sept 03]. Available from: <http://www.dive.sc.gov.br>.
- World Health Organization. Global tuberculosis control. Geneva: WHO, 2010.
- Forbes BA, Sahn DF, Weissfeld AS. *Mycobacteria*. Baily & Scott's Diagnostic Microbiology, 12th ed., pp. 497-503, 2007.
- Ngan GJY, Ng LM, Jureen R, Lin RTP, Teo JWP. Development of multiplex PCR assays based on the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer for the detection of clinically relevant nontuberculous mycobacteria. *Lett Appl Microbiol* 52(5):546-454, 2011.
- Bergval IL, Vijzelaar RNCP, Dalla Costa ER, Schuitema ARJ, Oskam L, Kritski AL, et al. Development of multiplex assay for rapid characterization of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 46(20):689-699, 2008.
- Del Portillo P, Thomas MC, Martinez E, Valladares CMN, Valladares B, Patarroyo, MEP, et al. Multiplex PCR system for differential identification of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 34(2):324-328, 1996.
- Macedo GC, Bozzi A, Weinreich HR, Bafica A, Teixeira HC, Oliveira SC. Human T cell and antibody-mediated responses to the *Mycobacterium tuberculosis* recombinant 85A, 85B, and ESAT-6 antigens. *Clin Dev Immunol* 2011: 351573, 2011.
- Metaxa-Mariatou V, Vakalis N, Gazouli M, Natsioulas G. The 500-base-pair fragment of the putative gene RvD1-Rv2031c is also present in the genome of *Mycobacterium tuberculosis*. *In Vivo* 18(1):33-35, 2004.
- Thierry D, Brisson-Nöel A, Frebault VLV, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol* 28(12):2668-2673, 1990.
- Van Soolingen D, De Hass PEW, Hermans PWM, Van Embden JDA. RFLP analysis of mycobacteria. National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, The Netherlands, 1994.
- Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction analysis. *J Clin Microbiol* 31(2):175-178, 1993.
- Shinnick TM, Good RC. *Mycobacterial taxonomy*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 13:884-901, 1994.
- Kent PT, Kubica GP. *Public health mycobacteriology – a guide for the level III laboratory*. U.S. Department of Health and Human Services publication (CDC) 86-8230. Centers for Disease Control, Atlanta, Ga, 1985.
- Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts GD, Böttger EC. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol* 34:296-303, 1996.
- Ruiz M, Rodriguez JC, Escibano I, Garcia-Martinez J, Rodriguez-Valera F, Royo G. Application of molecular biology techniques to the diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. *APMIS* 109(12):857-864, 2001.
- Pinsky BA, Banaei N. Multiplex real-time PCR assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex members to the species level. *J Clin Microbiol* 46(7):2241-46, 2008.
- Park H, Kim C, Park KH, Chang CL. Development and evaluation of triplex PCR for direct detection of mycobacteria in respiratory specimens. *J Appl Microbiol* 100(1):161-167, 2006.

Curriculum Vitae abreviado de la autora

Rosemeri Maurici da Silva. Médica especialista em Medicina Interna e Pneumologia, Mestre em Ciências Médicas e Doutora em Ciências Pneumológicas. Professora do Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brasil. Atualmente atua como Coordenadora do Programa de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade do Sul de Santa Catarina. Membro da Comissão de Infecções Respiratórias e Micoses da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia.