

ENFERMEDAD NEUROLÓGICA POR ADENOVIRUS

CRISTINA L. LEMA¹, DANIEL M. CISTERNA¹, MARIA CECILIA FREIRE¹¹Servicio de Neurovirosis, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. ANLIS - Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires

Resumen El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de adenovirus (ADV) en las infecciones del sistema nervioso central (SNC). Se analizaron 108 muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) provenientes de 79 casos de encefalitis, 7 meningitis y 22 de otras patologías neurológicas, recibidas en el período 2000-2002. Cuarenta y nueve (47.35%) se obtuvieron de pacientes inmunocomprometidos. La presencia de ADV se investigó mediante reacción en cadena de la polimerasa en formato anidado (*Nested-PCR*). La identificación del genogrupo se realizó mediante análisis filogenético de la secuencia nucleotídica parcial de la región que codifica para la proteína del hexón. Se detectó la presencia de ADV en 6 de 108 (5.5%) muestras de LCR analizadas. Todos los casos positivos pertenecieron a pacientes con encefalitis que fueron 79, (6/79, 7.6%). No se observó diferencia estadísticamente significativa entre los casos de infección por ADV en pacientes inmunocomprometidos e inmunocompetentes ($p>0.05$). Las cepas de ADV detectadas se agruparon en los genogrupos B1 y C. En conclusión, nuestros resultados describen el rol de los ADV en las infecciones neurológicas en Argentina. La información presentada contribuye al conocimiento de su epidemiología, en particular en casos de encefalitis.

Palabras clave: adenovirus, encefalitis, enfermedad neurológica

Abstract *Neurologic disease due to adenovirus infection.* The aim of this study was to assess the prevalence of adenovirus (ADV) infections in neurological disorders. A total of 108 cerebrospinal fluid (CSF) samples from 79 encephalitis cases, 7 meningitis and 22 other neurological diseases analysed in our laboratory between 2000 and 2002 were studied. Forty nine (47.4%) belonged to immunocompromised patients. Viral genome was detected using nested polymerase chain reaction (*Nested-PCR*) and ADV genotypes were identified using partial gene sequence analysis of hexon gene. Adenovirus were detected in 6 of 108 (5.5%) CSF samples tested. All of these were from encephalitis cases, 6/79, representing 7.6% of them. No statistically significant differences were observed ($p>0.05$) between the immunocompromised and non immunocompromised patients with ADV infection of the central nervous system. Two ADV genotypes (B1 and C) were identified. In conclusion, our results describe the role of ADV in neurologic infections in Argentina. The results contribute to the knowledge of ADV epidemiology, specially in encephalitis.

Key words: adenovirus, encephalitis, neurologic disorder

Los Adenovirus (ADV) humanos pertenecen al género *Mastadenovirus* de la familia Adenoviridae. Son virus ADN de doble cadena lineal no envueltos que poseen una cápside de estructura icosaédrica, siendo la proteína mayoritaria el hexón¹. Se clasifican mediante ensayos de neutralización en 51 serotipos diferentes. En base a las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se agrupan en 6 genogrupos (A -F)^{2,3}.

Los ADV producen un amplio espectro de enfermedades clínicas. Los del genogrupo A y F se asocian a enfermedades gastrointestinales^{4,5}. El genogrupo B está for-

mado por 2 subgrupos (B1 y B2). El subgrupo B1 se encuentra con mayor frecuencia en infecciones respiratorias agudas, mientras que el B2 se lo aísla a partir del tracto urinario⁶. El genogrupo C causa comúnmente infecciones respiratorias, mientras que algunos serotipos del genogrupo D se asocian a infecciones oculares^{7,8}. Finalmente, el genogrupo E, produce infecciones respiratorias y oculares⁶.

La infección del sistema nervioso central por ADV es infrecuente, siendo la encefalitis aguda la manifestación neurológica más importante. El serotipo 7 (genogrupo B1), es el más comúnmente aislado de líquido cefalorraquídeo (LCR) o cerebro. También se han detectado otros serotipos aunque en forma menos frecuente: serotipo 3 (genogrupo B1), serotipos 1, 2, 5, 6 (genogrupo C) y serotipo 12 (genogrupo A)⁹.

En Argentina, la epidemiología de los ADV ha sido ampliamente estudiada en las infecciones respiratorias

Recibido: 15-XI-2004

Aceptado: 18-IV-2005

Dirección postal: Dra. Cristina L. Lema, Servicio de Neurovirosis, Departamento de Virología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS, Dr. Carlos G. Malbrán, Av. Vélez Sarsfield 563, 1281 Buenos Aires, Argentina.

Fax: (54-11) 4303-1433

e-mail: clema@anlis.gov.ar

y gastrointestinales. Adenovirus es el segundo agente causal de infecciones respiratorias agudas bajas, en niños menores de 5 años^{10,11}. Se han identificado en estos casos cepas pertenecientes a los genogrupos B y C. En particular, se ha notificado el predominio del serotipo 7 y la alta letalidad de sus variantes genómicas 7h y 7i^{12,13,14}. Igualmente, en Chile y Uruguay se ha descrito el predominio del serotipo 7 en una infección respiratoria aguda baja^{15,16}. Finalmente, la gastroenteritis viral se asocia a ADV 40 y 41 en Argentina^{5,17}.

En conclusión, el rol de los ADV en las infecciones neurológicas no ha sido establecido en nuestro país. Con el objeto de determinar su importancia en este tipo de infecciones, se investigó la presencia de ADV en 108 muestras de LCR obtenidas de pacientes con distintas enfermedades neurológicas, recolectadas en el período 2000-2002.

Materiales y métodos

Pacientes y muestras. El Servicio de Neurovirosis del INEI-ANLIS-Dr. Carlos G. Malbrán es un centro de derivación nacional para el estudio de las patologías neurológicas producidas por virus. La presencia de ADV se investigó en forma prospectiva en 108 muestras de LCR obtenidas de pacientes con diversas enfermedades neurológicas recibidas en el período 2000-2002. Se examinaron casos de encefalitis (n=79), meningitis (n=7) y otras patologías neurológicas (n=22): leucoencefalopatía multifocal progresiva (n=6), parálisis aguda flácida (n=6), accidente cerebro vascular (n=3), mielitis (n=2), enfermedad desmielinizante (n=1), masa ocupante cerebral (n=1), paraparesia espástica tropical (n=1), neuropatía (n=1) y vasculitis (n=1).

De los 108 pacientes, 79 (73.2%) eran de sexo masculino, 28 (25.9%) de sexo femenino y 1 (0.9%) sin datos. El rango de edades de la población fue de 1 día de vida hasta 88 años de edad, con un promedio de 21.1 años. Cuarenta y nueve (45.37%) pacientes eran inmunocomprometidos: HIV/SIDA (n=43), transplantado renal (n=2), leucemia linfocítica aguda (n=2), leucemia mielocítica aguda (n=1) y sin detalles del motivo de la inmunosupresión (n=1). En los 79 casos de encefalitis analizados, treinta y seis (45.6%), presentaron inmunosupresión, mientras que en los casos de meningitis se observó en 1/7 (14.3%) y en el resto de las enfermedades neurológicas estudiadas en 12/22 (54.5%).

Finalmente, con el objeto de conocer la circulación de los genogrupos de ADV en nuestro país, se analizaron 13 cepas aisladas en cultivo celular a partir de muestras de materia fecal (MF) de pacientes con parálisis aguda flácida (PAF) obtenidas entre 1994 y 1999.

Amplificación del genoma viral. El ácido nucleico viral se extrajo de las muestras de LCR utilizando isotiocianato de guanidinio, como se ha descrito previamente¹⁸. Las muestras de materia fecal se resuspendieron con medio esencial mínimo (MEM) y se centrifugaron a 2000 RPM durante 5 minutos a 4° C. El sobrenadante se procesó de la misma manera que los LCR. La detección del genoma de ADV se realizó por una técnica de reacción en cadena de la polimerasa en formato anidado (*Nested-PCR*) que utiliza iniciadores dirigidos a la región del genoma que codifica para la proteína hexón, como se ha descrito previamente¹⁹. Los productos de PCR de 168 pares de bases se visualizaron en un gel de agarosa al 2%.

La reacción de PCR se realizó en las condiciones adecuadas para minimizar la contaminación e inhibición de las muestras: (i) uso de laboratorios separados para la preparación de las mezclas de reacción, manipulación de las muestras, amplificación y visualización de los amplificadores, (ii) utilización de controles positivos y negativos en todos los ensayos.

Secuenciación y análisis filogenético. Los productos de la reacción de PCR en formato anidado se utilizaron para determinar la secuencia nucleotídica. Se purificaron con *Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega)* y se secuenciaron, en ambos sentidos, en un secuenciador de ADN automático *ABI PRIMS 337*, usando el *kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing (Perkin Elmer Biosystems)*. Se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de 19 cepas de ADV, las cuales fueron corregidas y alineadas con los programas *Chromas* (versión 1.45) y *Clustal X* (versión 1.8)²⁰. Para su comparación, se incluyeron en el análisis filogenético, secuencias de cepas de ADV obtenidas en la base de datos de genes disponibles en internet (*GenBank*). Las secuencias nucleotídicas se analizaron mediante el programa *Mega 2.1*²¹. Las distancias evolutivas fueron estimadas usando el método de 2 parámetros de Kimura. El árbol filogenético se construyó utilizando el algoritmo de *Neighbor-Joining*. Para obtener los valores de remuestreo se realizaron 1000 réplicas del set de datos.

Los números de acceso de las secuencias de cepas de ADV utilizadas, son los siguientes: Serotipo 12: X73487 y NC001460. Serotipo 31: X74661. Serotipo 3: X76552 y X76549. Serotipo 7: U77393, U77391, U75953, U75954 y AF065068. Serotipo 34: AB052911. Serotipo 35: AB052912. Serotipo 5: J01966 y X02997. Serotipo 9: X74664. Serotipo 15: X74667 y X74666. Serotipo 19: AB023550 y X98359. Serotipo 37: X98360. Serotipo 48: U20821. Serotipo 4: AF065062 y X84646. Serotipo 41: D13781 y X51783.

Detección de virus neurotrópicos. Se investigó la presencia de otros agentes virales neurotrópicos, en las muestras de LCR positivas para ADV mediante PCR en formato anidado específica para el virus herpes simplex (HSV), el virus varicela zoster (VZV), citomegalovirus (CMV) y virus JC (JCV). Todas las reacciones de PCR se realizaron como han sido descritas previamente^{22,23}.

Pruebas estadísticas. Para determinar si existió relación estadísticamente significativa entre el hallazgo de ADV en la muestra de LCR y el estado de inmunidad del paciente, se realizó el *Test Fisher*, incluido en el paquete *Epi Info 6.4*.

Resultados

Detección de ADV en LCR. Se detectó la presencia de ADV en 6 de 108 (5.5%) muestras de LCR analizadas. Todos los casos positivos pertenecían a pacientes con encefalitis, 6/79 (7.6%). No se detectó ADV en muestras de casos de meningitis ni en el resto de los síndromes neurológicos investigados.

Se detectó ADV en 4 de 36 (11.1%) pacientes con inmunosupresión y en 2 de 43 (4.65%) inmunocompetentes. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre ambas poblaciones ($p=0.2566879$).

Para identificar posibles infecciones múltiples, en la encefalitis causadas por ADV, se investigó la presencia de HSV, VZV, CMV y JCV mediante PCR anidada. Se detectó CMV en un trasplantado renal (262-00) sin compromiso respiratorio. En el resto de las muestras no se

TABLA 1.- Casos de encefalitis asociados a adenovirus en Argentina (2000-2002)

N° Muestra	Edad (años)	Sexo	Enfermedad respiratoria	Clase de Inmunocompromiso	Genogrupo
262-00	54	Masc.	No	Tx. renal*	C
347-00	12	Fem.	No	No	C
408-01	25	Masc.	No	HIV/SIDA	B1
420-01	37	Masc.	No	HIV/SIDA	B1
324-02	32	Fem.	No	HIV/SIDA	B1
452-02	0.5	Masc.	Neumonía	No	B1

* Tx renal: trasplantado renal

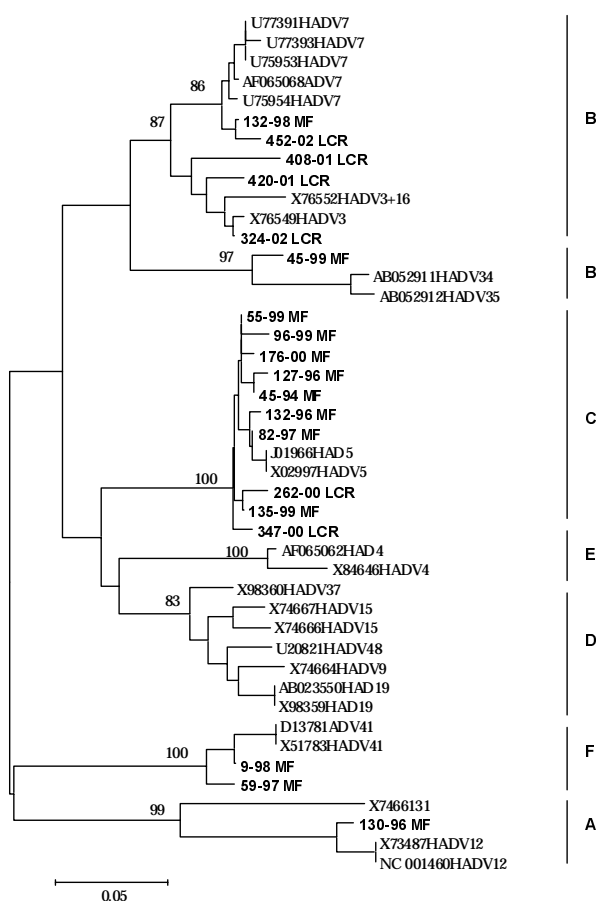


Fig. 1.- Análisis filogenético de cepas de ADV. Se analizaron con el método de Neighbor-Joining las secuencias nucleotídicas correspondientes a la región 3' del gen del hexon. En el análisis se incluyeron cepas representativas de los 6 genogrupos y 20 cepas aisladas en el presente trabajo (en negrita).

encontró ninguno de los virus neurotrópicos investigados (Tabla 1).

Identificación de genogrupos. Para determinar el genogrupo de las cepas neurovirulentas de ADV, se cons-

truyó un árbol filogenético con las secuencias nucleotídicas de al menos dos cepas representativas de cada uno de los genogrupos conocidos. Como se muestra en la Figura 1, las mismas segregaron en 6 genogrupos designados de A-F. El genogrupo B se dividió en 2 subgrupos, denominados B1 y B2. Las cepas de ADV detectadas en las muestras de LCR se agruparon en los genogrupos B1 (n=4) y C (n=2); mientras que los 13 aislamientos de ADV obtenidos en materia fecal se agruparon en los genogrupos C (n=8), F (n=2), B1 (n=1), B2 (n=1) y A (n=1). No se detectaron cepas de los genogrupos D ni E.

La cepa de ADV 452-02 obtenida de un paciente con neumonía y sin inmunosupresión segregó en el subgrupo B1. Mostró un 98.1% y 94.1% de identidad nucleotídica promedio con las cepas serotipo 7 y 3 respectivamente, representantes de dicho subgrupo.

Discusión

Los adenovirus afectan a millones de personas en el mundo causando manifestaciones clínicas muy diversas. Existe escasa información sobre su importancia como agentes causantes de enfermedades neurológicas. Utilizando métodos clásicos para la detección viral se describió que provocan el 1% de las encefalitis de origen viral⁹. Por otra parte, en informes más recientes donde se utilizó la técnica de PCR, se encontró ADV en el 4% de los casos de encefalitis²⁴. En nuestro estudio, la prevalencia encontrada fue superior (7.6%), posiblemente debido a la mayor sensibilidad de la técnica de PCR "anidada" utilizada. Además, no se detectó ADV en casos de meningitis u otros síndromes neurológicos analizados, mostrando la escasa importancia de este virus en estas enfermedades, igual a lo descrito en informes previos^{1,9}.

No se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los casos de ADV en pacientes inmunosuprimidos e inmunocompetentes. Cuatro de los casos de pacientes inmunocomprometidos eran adultos, (3 HIV positivos y 1 trasplantado renal). Si bien los casos en

adultos no presentaron enfermedad respiratoria, no se puede descartar que exista una relación entre ambas patologías. Muchos casos de infección grave, en pacientes inmunosuprimidos, son producidos por serotipos comunes, que en la población normal producen infecciones autolimitadas²⁵. Por otro lado, dos pacientes inmunocompetentes eran niños, uno de los cuales presentó neumonía y en el que se detectó una cepa de ADV con 98% de identidad nucleotídica con el serotipo 7, frecuentemente asociado a este tipo de cuadros. Estos resultados son coincidentes con informes que indican que las encefalitis causadas por ADV se producen frecuentemente como complicación de una enfermedad respiratoria grave¹.

En pacientes inmunosuprimidos es frecuente detectar infecciones neurológicas producidas por dos o más virus. En este estudio, un paciente trasplantado renal (262-00) presentó una coinfección con CMV. La presencia de CMV en LCR no indica necesariamente su participación etiológica en el cuadro clínico, aunque tampoco puede descartarse una posible acción sinérgica entre ambos agentes, como se ha descrito para el virus de HIV²⁶.

La información existente acerca de los genogrupos de ADV asociados a la enfermedad neurológica es escasa y está fundamentalmente referida a casos de encefalitis. En estos casos, el genogrupo B1 es el más comúnmente aislado de LCR o cerebro, aunque también se han detectado el A y el C⁹. Los resultados de nuestro estudio son coincidentes con lo descrito anteriormente. Las cepas detectadas en las muestras de LCR pertenecen a los genogrupos B1 y C. Además, el análisis de las cepas de ADV aisladas de materia fecal, aunque fueron recolectadas en un período previo a este estudio (1994-2000), nos permitió detectar una gran diversidad de genogrupos circulando en la población, contrariamente a lo observado en los casos neurológicos. Por otra parte, es interesante destacar que los geno-grupos B y C identificados en los casos de encefalitis, son los que frecuentemente causan enfermedades respiratorias agudas bajas en nuestro país. En consecuencia, la patología neurológica podría estar asociada a factores relacionados con el huésped (complicación de la enfermedad respiratoria de base) o con características propias de las cepas detectadas en estos casos (neurovirulencia o neuroinvasividad). Es necesario realizar otros estudios que permitan determinar los mecanismos patogénicos utilizados por adenovirus para producir enfermedades en el sistema nervioso central.

En conclusión, nuestros resultados describen el rol de los adenovirus en las infecciones neurológicas en Argentina. La información presentada contribuye al conocimiento de su epidemiología, en particular en casos de encefalitis.

Agradecimientos: Este estudio fue financiado por el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS Dr. Carlos G. Malbran, Ministerio de Salud, Argentina. Los autores agradecen a los Dres. J. Echaverría y Dra. Ana Avellón del Instituto Carlos III, Madrid, España, por su colaboración en la transferencia de la tecnología utilizada para el diagnóstico de adenovirus.

Bibliografía

1. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases. In: Churchill- Livingstone (eds). Adenovirus. 5th ed. 2000, p 1624-30.
2. Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Mayo MA, and McGeoch DJ (eds). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Family Adenoviridae, p 227-237. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, Calif: Academic Press, 1999.
3. De Jong JC, Wermenbol AG, Verweij-Uijterwaal MW, et al. Adenoviruses from Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3940-5.
4. Uhnou I, Wadell G, Sevansson L, Johansson ME. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *J Clin Microbiol* 1984; 20: 365-72.
5. Mistchenko AS, Huberman KH, Gomez JA, Gristein S. Epidemiology of enteric adenovirus infection in prospectively monitored Argentine families. *Epidemiol Infect* 1992; 109: 539-46.
6. Wadell G. Molecular epidemiology of human adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 1984; 110: 191-220.
7. Brandt CD, Kim HW, Vargosko AJ, et al. Infections in 18000 infants and children in a controlled study of respiratory tract disease. I. Adenovirus pathogenicity in relation to serologic type and illness syndrome. *Am J Epidemiol* 1969; 90: 484-500.
8. Hierholzer JC, Stone YO, Broderson JR. Antigenic relationships among the 47 human adenoviruses determined in reference horse antisera. *Arch. Virol* 1991; 121: 179-97.
9. Jhonson, RT. Viral infections of the nervous system. In: Lippincott-Raven (eds). Meningitis, Encefalitis and Poliomyelitis. 2nd ed. New York: 1998, p 102-4.
10. Carballal G, Videla CM, Espinosa MA, et al. Multicentered study of viral acute lower respiratory infections in children from four cities of Argentina, 1993-1994. *J Med Virol* 2001, 64: 167-74.
11. Weissenbacher M, Carballal G, Avila M, et al. Etiologic and clinical evaluation of acute lower respiratory tract infections in young Argentinian children: an overview. *Rev Infect Dis*, 1990; 12 (Suppl 8): S889-98.
12. Carballal G, Videla C, Misirlan A, Requeijo PV, Aguilar MC. Adenovirus type 7 associated with severe and fatal acute lower respiratory infections in Argentine children. *BMC Pediatrics* 2002; 2: 6.
13. Kajon AE, Wadell G. Molecular epidemiology of adenoviruses associated with acute lower respiratory disease of children in Buenos Aires, Argentina (1984-1988). *J Med Virol*, 1992; 36: 292-7.
14. Videla C, Carballal G, Kajon A. Genomic analysis of adenovirus isolated from Argentinian children with acute lower respiratory infections. *J Clin Virol*, 1999; 14: 67-71.

15. Kajon AE, Mistchenko AS, Videla C, Hortal M, Wadell G, Avendano LF. Molecular epidemiology of adenovirus acute lower respiratory infections of children in the south cone of South America (1991-1994). *J Med Virol* 1996; 48: 151-6.
16. Kajon AE, Suarez MV, Avendano LF, Hortal M, Wadell G. Genome type analysis of South American adenoviruses of subgenus C collected over a 7-year period. *Arch Virol* 1993; 132: 29-35.
17. Bereciartu A, Bok K, Gomez J. Identification of viral agents causing gastroenteritis among children in Buenos Aires, Argentina. *J Clin Virol* 2002; 25: 197-203.
18. Casas I, Powell L, Klapper PE, Cleator GM. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods* 1995; 53: 25-36.
19. Avellón A, Pérez P, Aguilar JC, Ortiz de Lejarazu R, Echeverría JE. Rapid and sensitive diagnosis of human adenovirus infections by a generic polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 2001; 92: 113-20.
20. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins, DG. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 1997; 24: 4876-82.
21. Kumar S, T.K, Nei M. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. *Comput Appl Biosci* 1994; 10: 189-91.
22. Casas I, Tenorio A, Echeverría JM, Klapper PE, Cleator GM. Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification. *J Virol Methods* 1997; 66: 39-50.
23. Fedele CG, Ciardis M, Delia S, Echeverría JM, Tenorio A. Multiplex polymerase chain reaction for the simultaneous detection and typing of polyomavirus JC, BK and SV40 DNA in clinical samples. *J. Virol Methods* 1999; 82: 137-44.
24. Lee T-C, Tsai C-P, Yuan C-L, et al. Encephalitis in Taiwan: A prospective hospital-based study. *J Infect Dis* 2003; 56: 193-9.
25. Kojaghlanian T, Flomenberg P, Horwitz M. The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Rev Med Virol*, 2003; 13: 155-71.
26. Griffiths P. Cytomegalovirus infection of the central nervous system. *Herpes* 2004; (Suppl 2): 95A-104A.

LA PORTADA

Mención Especial del Jurado

Concurso Nacional de Afiches en Escuelas de 11 Provincias.

Tema: Eliminemos la tuberculosis: ¡ya es hora!

Collage y acrílico, 60 x 45 cm.

La tuberculosis continúa siendo un serio problema de salud en nuestro país. En 2003 se notificaron cerca de 12 000 casos, y unas 1000 muertes por esta enfermedad (Programa Nacional de Control de Tuberculosis, Ministerio de Salud). A inicios de 2004, este Programa, que tiene su sede en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Emilio Coni, Santa Fe, (INER), preparó una Guía de actividades de comunicación y educación para la salud, dirigida a escolares. Con esa guía el tema "La tuberculosis" fue tratado en escuelas públicas y privadas de las provincias, y se organizó un concurso nacional de afiches, para el 3er. Ciclo EGB (Educación General Básica) que fue lanzado el 24 de marzo, coincidiendo con el *día mundial de la tuberculosis*. Cada escuela participante seleccionó dos obras, que se enviaron al Programa Provincial de Control de la Tuberculosis. Cada provincia formó un jurado que eligió, a su vez, dos obras para representarla, que envió al INER en septiembre de 2004. El 5 de noviembre de ese año se reunió un Jurado Nacional en el INER, que seleccionó las obras más destacadas tomando en consideración la interpretación del mensaje: *Eliminemos la tuberculosis: ¡ya es hora!*, y las técnicas utilizadas. Participaron las provincias de Catamarca, Chaco, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Río Negro, Salta, San Luis y Santa Cruz. El *Premio Mención Especial del Jurado*, que se reproduce como tapa de *Medicina (Buenos Aires)* por gentileza del INER, fue otorgado al Colegio N° 2 Cesáreo Bernardo de Quirós, de Paraná, Entre Ríos, y sus autores son Mauro Leyes, Flavia López, Lautaro Ortellao, Yanina Vera Zabala y Lorena Villanueva, de 9º Año.

Mauro Leyes, uno de los autores explicó: "Luego de un trabajo teórico, quisimos representar las distintas etapas de la enfermedad, donde el fondo refleja los estados: del negro pasa al marrón, y luego al rojo, con la idea de cómo se van recuperando tanto los pulmones como el cuerpo, en este caso la cara del paciente".