

11219 3



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Medicina
Instituto Mexicano del Seguro Social
Hospital de Pediatría - Centro Medico Nacional Siglo XXI

"Frecuencia de Infección por Borrelia burgdorferi y caracterización clínica en pacientes con parálisis facial, en población derechohabiente del IMSS. Zona sur del Distrito Federal"

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE
I N F E C T O L O G O
P R E S E N T A :
DRA. IRERI GARCÍA JUÁREZ

TUTOR:

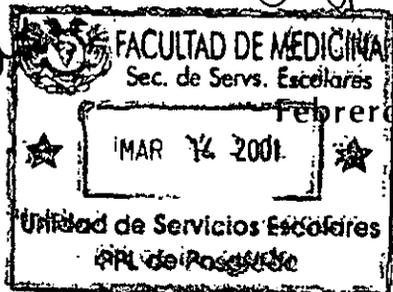
Dra. María Guadalupe Gordillo Pérez.

COTUTOR:

Dr. Fortino Solórzano Santos



México D.F.



252354



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

CONTENIDO	Paginas.
1 - Resumen	1
2 - Abstract	2
3 - Antecedentes	3
4 - Planteamiento del problema.	8
5 - Objetivos I Objetivo general	
II Objetivos específicos	
III Objetivos secundarios.	9
6 - Justificación	10
7 - Hipótesis	11
8 - Matenal y Métodos. I. Lugar de realización del estudio.	
II. Diseño de la investigación.	
III. Diseño del estudio.	12
9 - Cntenos de selección. I. Criterios de inclusión.	
II. Criterios de no inclusión.	
III. Criterios de eliminación.	13
10 - Tamaño de la muestra.	13
11 - Definición de caso.	14
12 - Interpretación de estudios serológicos.	14
13 - Analisis estadístico.	15
14 - Descripción general del estudio.	17
15 - Interpretación de resultados.	19
16 - Resultados	21
17 - Discusión	24
18 - Conclusiones.	27
19 - Tabla 1 Incidencia mensual de pacientes con parálisis facial en la UMR SXXI y casos estudiados.	28
20.- Tabla 2. Frecuencia de infección de acuerdo a agente etiológico.	28
21.- Tabla 3. Características clínicas de pacientes con parálisis facial infectados por <i>B burgdorferi</i> .	29
22 - Tabla 4 Bandas encontradas con mayor frecuencia en el Western-Blot	31
23 - Tabla 5 Características demográficas y clínicas de <i>B. burgdorferi</i> y VHS	32
24 - Anexo 1 Hoja de recolección de datos.	33
25 - Anexo 2 Hoja de consentimiento informado.	36
26 - Anexo 3. Flujograma de actividades.	37
27.- Anexo 4 Hoja de reporte de resultados.	38
28 - Anexo 5 Descripción de técnicas de laboratorio.	
I - Inmunoensayoenzimático IgG vs <i>B.burgdorferi</i> .	39
II.- Técnica para de Western-Blot IgG vs <i>B.burgdorferi</i> .	40
III.- Inmunoensayoenzimático IgM/HSV-1.	
IV.- Inmunoensayoenzimático IgM/HSV-2.	
V.- Inmunoensayoenzimático IgM/EBV.	
VI - Inmunoensayoenzimático IgM/CMV	
29.- Referencias.	48

Este proyecto fue realizado con el apoyo de CONACYT.
Número de proyecto: 30694-M

AGRADECIMIENTOS

A mis padres.

Gracias por ayudarme a convertir mi más grande sueño en una realidad.

Sin su amor y comprensión no lo hubiera logrado, a ustedes les debo todo cuanto soy.

A mi hermano.

Esperando que esto sea un estímulo para ti, si yo pude tu puedes.

Levántate y crece, recuerda que solo el esfuerzo, la lucha y el trabajo vencen todos los obstáculos y te hacen ser fuerte.

A mis amigos Verónica, Gregorio y José Antonio.

Porque a pesar del tiempo y la distancia siempre han estado presentes en mi corazón.

A la Dra. Gordillo y a los miembros del servicio de Infectología.

Con mi más profundo respeto y admiración.

RESUMEN

Introducción: La Borreliosis de Lyme es una enfermedad emergente, causada por *Borrelia burgdorferi*. En los últimos años se ha incrementado el número de casos y se ha diseminado a zonas urbanas. En México se han reportado casos desde 1990, sin lograrse su confirmación. En 1999 Gordillo y cols, encuentran una seroprevalencia del 0.3% de infección por *B. burgdorferi*. En este mismo año se documentan casos con manifestaciones neurológicas en el DF. La parálisis facial es la forma de presentación más frecuente de neuroborreliosis presentándose en más del 11% de pacientes con Borreliosis de Lyme.

Objetivo: Determinar la frecuencia de infección por *B. burgdorferi*, su caracterización clínica y epidemiológica en pacientes con parálisis facial.

Material y Métodos: Estudio transversal comparativo. Los pacientes se estudiaron en el Hospital de Medicina Física y Rehabilitación de Villa Coapa Siglo XXI. Zona Sur del DF. Se incluyeron pacientes con parálisis facial aguda idiopática de 1 día a 8 semanas de evolución, diabéticos e hipertensos controlados. Se eliminaron pacientes a los que no se realizó una segunda serología y cuando se encontró etiología no infecciosa de la parálisis. Se interrogaron antecedentes de exposición y manifestaciones clínicas de Borreliosis de Lyme. Se determinaron anticuerpos IgG para *B. burgdorferi* mediante ELISA, se confirmó el resultado con Western-Blot. Se realizó ELISA IgM para descartar otra etiología infecciosa como HSV-1, HSV-2, CMV, y EBV. A las 4 semanas se hizo nueva serología para buscar seroconversión.

Resultados: Se incluyeron 191 pacientes con una edad promedio de 45 ± 17 años, relación de sexo M: F de 1:1.1; los pacientes ingresaron al estudio con una mediana de 10 días de evolución. La parálisis fue unilateral en 188 pacientes y en bilateral 3 casos. En 37/191 (19.8%) se presentó parálisis facial recurrente. En 12 pacientes (6.2%) se identificaron anticuerpos IgG vs *B. burgdorferi*; el 75% de estos casos cursaron con datos clínicos sugestivos de Borreliosis como: parálisis facial recurrente, artritis, artralgiás, síndrome del túnel del carpo y bloqueo AV. El 24% de los pacientes presentaron IgM contra virus del grupo Herpes, HSV-1 en 7.8%, HSV-2 en el 9%, CMV en el 4% y EBV en el 3%. La seroconversión a las 4 semanas fue del 33%. La recuperación de los pacientes infectados por *B. burgdorferi* y virus del grupo Herpes fue del 83% a las 8.5 semanas vs 4.6 semanas en pacientes no infectados ($p < 0.005$). El riesgo de recurrencia de parálisis facial fue 2.9 veces mayor en pacientes infectados por *B. burgdorferi* que en no infectados.

Conclusiones: Se documentó infección por *B. burgdorferi* en el 6.2% de los casos de parálisis facial, la mayoría de estos casos presentaron otras manifestaciones clínicas características de la fase temprana diseminada de Borreliosis. Los casos de recurrencia son más frecuentes en pacientes infectados por *B. burgdorferi*. En el 30% de los casos de parálisis facial se encontró etiología infecciosa asociada. El tiempo de recuperación de los pacientes con infección asociada fue mayor que en los no infectados.

ABSTRACT

Lyme Borreliosis is an emerging disease caused by the spirochete *Borrelia burgdorferi*. It is a multisystemic disorder involving mainly the skin, joints as well as neurologic and cardiac involvement. Neuroborreliosis encloses 40% of Borreliosis in the USA and 65% in Europe. Facial palsy is the most common neurological manifestation, it is present in more than 11% of patients. A National seroepidemiologic survey in Mexico made in 1999 reported a seroprevalence of 0.3%, with most of the cases located in the Northeast and in Mexico city. A regional survey in Mexico city in 2000 year showed a seroprevalence of 3.2%. In that same year neuroborreliosis cases were confirm in this city.

Objective: Determine the frequency of *B. burgdorferi* infection and clinical characterization in patients with facial palsy in Mexico city.

Materials and Methods: Cross sectional study. Patients with facial palsy, with a time of evolution of 1 to 60 days, attending in a physical therapy clinic (UMFR Siglo XXI), in the south area of Mexico city. Exposure to ticks and clinical manifestations suggesting Lyme Borreliosis, and Herpes virus disease were investigated. IgG ELISA vs *B. burgdorferi* was performed, and the positive cases were confirmed by Western-Blot. IgM ELISA vs Herpes virus (HSV-1, HSV-2, CMV, EBV) was performed to ruled-out another infectious etiology. In the seronegative cases a second serology was made 4 weeks later looking for seroconversion.

Results: 191 patients were included with a mean age of 45 ± 17 years, M:F ratio of 1:1.1; the patients were included in the study with a 10 evolution days average. The facial palsy was unilateral in 188 patients and bilateral in 3 cases. In 37/191 (19.8%) recurrent facial palsy was present. In 12 patients (6.2%) IgG antibodies vs *B. burgdorferi* were identified; the 75% of these cases had clinical manifestations suggesting Borreliosis, which were: recurrent facial palsy, arthritis, arthralgias, carpa tunnel Syndrome and auriculoventricular blockade. 24% of patients had IgM antibodies vs Herpes virus, HSV-1 in 7.8%, HSV-2 9%, CMV 4% and EBV 3%. There was 33% of seroconversion rate at 4 weeks of. The recovery of infected patients was 83% at 8.5 weeks vs 4.6 weeks in not infected patients ($p < 0.005$). The recurrence risk of facial palsy was 2.9 times higher in *B. burgdorferi* infected patients than in not infected patients.

Conclusions: *B. burgdorferi* infection was documented in the 6.2% of facial palsy cases, most of these patients presented other clinical manifestations of early disseminated stages. Facial palsy recurrence was more common in *B. burgdorferi* infected patients. In 30% of the cases there was associated an infectious etiology. The time of recovery of the infected patients was longer than in not infected patients.

ANTECEDENTES

La Borreliosis de Lyme es una enfermedad emergente, causada por la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*, es transmitida al hombre mediante la mordedura de una garrapata del género *Ixodes*.⁽¹⁾

Los huéspedes más competente para mantener la garrapata, en su estadio inmaduro (larva y ninfa) son el ratón patas blancas (*Peromyscus leucopus*) y en su forma adulta el venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*). En la naturaleza se conocen hasta 20 huéspedes competentes entre mamíferos y aves.^(1,2)

La enfermedad tiene una distribución endémica en Europa, Estados Unidos de Norteamérica (EUA) y en algunos países asiáticos. En Norteamérica ocurre principalmente en tres áreas enzóticas (Costa Noreste, Medio oeste, y California) se han estimado 100 casos por cada 100,000 habitantes por año, con una prevalencia que varía del 1-10% y en Europa del 4% en la población general y del 8-27% en trabajadores forestales.^(2,3,4)

En los últimos años se ha incrementado el número de casos y se ha diseminado a nuevas áreas como zonas urbanas, encontrándose en ciudades como Nueva York en EUA. Este fenómeno es favorecido por la expansión de la ciudad al campo en zonas dónde se encuentran las condiciones de temperatura, vegetación, población de mamíferos silvestres y domésticos, presentándose la interacción de la espiroqueta con el hombre.^(5,6,7,8)

En la República Mexicana se han reportado casos sugestivos de Borreliosis de Lyme desde 1990 en Sinaloa y en la zona Noreste del país sin lograrse su confirmación.^(9,10)

En 1999 se realizó la encuesta seroepidemiológica nacional con sueros obtenidos en 1988 se encontró una seroprevalencia nacional del 0.3% confirmada con Western-Blot. Estos datos demuestran la presencia de infección por *B. burgdorferi* en nuestro país.⁽¹¹⁾

En el 2000 la encuesta regional realizada en la zona Noreste mostró una seroprevalencia del 6% y en el Distrito Federal del 3.2%. Este mismo año estudios realizados por Gordillo y cols encontraron casos con manifestaciones neurológicas. (meningoradiculoneuropatía) en el Valle de México confirmados con

estudios serológicos y moleculares que cubran los criterios del CDC y de la EUCLB para el diagnóstico.⁽¹²⁾

La Borreliosis de Lyme tiene una amplia gamma de manifestaciones clínicas con afección a piel, sistema nervioso, articulaciones y corazón. La enfermedad se ha dividido en dos fases. La fase temprana (localizada y diseminada) y la fase tardía. El inicio de las manifestaciones tempranas es generalmente dentro de las primeras 8 semanas después de la mordedura de la garrapata, se caracteriza por el desarrollo de eritema migrans usualmente acompañado de fiebre, malestar general, fatiga, mialgias y artralgias. Las manifestaciones tempranas diseminadas incluyen neuropatía craneal con parálisis del nervio facial, meningitis linfocítica, artritis y bloqueo aúnculoventricular. La fase tardía inicia aproximadamente 6 meses después, se caracteriza por artritis y alteraciones neurológicas.

(13, 14, 15, 16)

La fisiopatología de la enfermedad es poco clara, se ha propuesto que posterior a la llegada de la espiroqueta a diferentes órganos se produce una respuesta inflamatoria por parte del huésped secundaria a la presencia del microorganismo y en la fase tardía, se ve implicado un fenómeno inmunológico.^(17, 18, 19)

Las manifestaciones neurológicas incluyen meningitis, encefalitis, radiculoneuropatía y neuropatía craneal (parálisis del III, VI, VII pares craneales), inician a las cuatro semanas después del eritema migrans (Intervalo de 1-10 semanas).^(18, 19)

Las alteraciones neurológicas se presentan en el 32% de los pacientes con Borreliosis de Lyme en EUA y en Europa la frecuencia de neuroborreliosis es mayor, estimada en más del 40% de los casos.⁽²⁰⁾

En neuroborreliosis la parálisis facial es la manifestación más frecuente se presenta en EUA en el 25-50% y en el 65% de los pacientes en Europa. Estudios realizados en adultos en zonas endémicas de EUA, encuentran en pacientes con Borreliosis una frecuencia del 3-11% de parálisis facial ⁽²²⁻²³⁾

Cuando la parálisis facial se presenta como manifestación aislada el diagnóstico de Borreliosis de Lyme no se lleva a cabo, a menos que el paciente se encuentra en zona endémica ó presente otras manifestaciones clínicas que sugieran el diagnóstico de la enfermedad. Estas pueden presentarse en forma transitoria o pasar desapercibidas por el paciente y el médico. ⁽²³⁻²⁴⁾

Debido a que la parálisis del nervio facial es una manifestación de la fase temprana diseminada, la mayor parte de los casos ocurren al final de la primavera, durante el verano y en el otoño la frecuencia se incrementa a más de 50%. ⁽²⁴⁾

El diagnóstico de un paciente con parálisis facial secundaria a Borreliosis de Lyme es difícil, excepto que el paciente presente el rash característico de la enfermedad, por lo que el diagnóstico usualmente depende de los estudios serológicos. ⁽²⁵⁻²⁶⁾ En el 20% de los casos, la parálisis facial es la única manifestación y puede presentarse sin que exista antecedente de eritema migrans por lo que es clínicamente indistinguible de la parálisis de Bell. ⁽²⁶⁾

La parálisis facial como única manifestación tiene un buen pronóstico, cura en el 85% de los casos, el uso de antibióticos y/o esteroides no parecen influir directamente en el pronóstico y duración de la evolución. ⁽²⁷⁾ Sin embargo el manejo antimicrobiano debe ser administrado para prevenir las complicaciones tardías de la Borreliosis de Lyme. ^(27,28,29,30)

El diagnóstico de la infección se lleva a cabo mediante la medición de anticuerpos IgG, los cuáles se elevan desde la sexta semana apartir de la mordedura de la garrapata, de no encontrarse estos y existe la sospecha clínica, el examen debe repetirse a las 4-6 semanas de la primera determinación y en aquellos casos en que en que se encuentren anticuerpos vs *B burgdorferi* presentes, se debe llevar a cabo la confirmación serológica mediante Western-Blot. ⁽³¹⁾ En ciertos casos cuando

hay sintomatología de sistema nervioso central, el LCR es de utilidad con la realización de técnicas de biología molecular (PCR).^(31,33,34,35,36,37,38,39)

El diagnóstico de neuroborreliosis en individuos seropositivos con manifestaciones meníngeas o cefálicas, requiere de la presencia de eritema migrans, compromiso sistémico de Borreliosis de Lyme, anticuerpos vs *Borrelia burgdorferi* en LCR o suero. En ausencia de estos datos, los individuos seropositivos, con manifestaciones neurológicas compatibles con Borreliosis de Lyme no explicadas por otra causa, pueden recibir el nombre de "probable" neuroborreliosis.^(40,41,42)

Los criterios del CDC y de EUCALB para diagnóstico serológico se realizan con dos técnicas, un estudio de escrutinio como el inmunoensayo enzimático (ELISA) y otro de confirmación con inmunotransferencia (Western-Blot). Se requiere de que ambos estudios sean positivos, esto debido a que el ELISA puede dar resultados falsos positivos debido a reacción cruzada con otros microorganismos.^(43,44,45,46,47,48)

La etiología de la parálisis facial se ha atribuido a diversas causas, pero en la mayoría de los casos la etiología no es definida y se le denomina parálisis facial idiopática. Esta ha sido asociada a factores ambientales ó del huésped, tales como la exposición al frío, edad, antecedente familiar, embarazo ó menstruación, las causas no infecciosas incluyen traumatismos, neoplasias, vasculopatía, neuropatía diabética, crisis hipertensiva y en el 50% de los casos la etiología es infecciosa.⁽⁴⁹⁾

En México es poca la información epidemiológica sobre parálisis facial. En un estudio realizado en población derechohabiente del IMSS realizado en la Ciudad de México se identifican factores de riesgo no infecciosos para el desarrollo de parálisis facial idiopática.⁽⁵⁰⁾

Los microorganismos más frecuentes son *B. burgdorferi* en el 3-11%, el virus de *Herpes simplex tipo-1* en el 11%. *Herpes simplex tipo-2* ha sido asociado como agente etiológico de parálisis facial en el 3% de los casos por Yasuhi y cols. *Epstein – barr* y *Citomegalovirus* en el 4%, virus de *Varicela Zoster* en el 8%. en estos casos la parálisis sigue a una infección primaria o es secundaria a reactivación. En el 1% de los casos se atribuye a *adenovirus*, *virus de rubéola*, *virus de parotiditis*, e *influenza*.^(51,52,53,54,55,56,57)

Dentro de los estudios serológicos con los que se cuenta para el diagnóstico de infecciones virales, empleados con mayor frecuencia, es el ELISA para búsqueda de anticuerpos. Dentro de este tipo de métodos diagnósticos se ha reportado el cruce antigénico entre los alfa herpesvirus (HSV-1, HSV-2, VZV), por lo que Oohana y cols evalúan la especificidad de los kit comerciales (marca GULL®) encontrando para HSV-2 IgM una especificidad del 93.6%) y para HSV-1 del 90.9%.⁽⁵⁸⁾

Planteamiento del problema

En estudios realizados en México por Gordillo y cols, en la encuesta seroepidemiológica nacional de Borreliosis de Lyme, realizada en 1999 con sueros obtenidos en 1988, se encontró una seroprevalencia nacional del 0.3%. En el 2000 se encuentra una serprevalencia en el DF del 3.2%. Más tarde en el mismo año se lograron documentar casos con manifestaciones neurológicas (meningoradiculopatía) en el Valle de México.

Dado que la parálisis facial es la forma de presentación neurológica más frecuente en Borreliosis de Lyme y en la mayoría de los casos no se realiza el diagnóstico etiológico es necesaria la búsqueda de casos de parálisis facial para establecer con que frecuencia estos son secundarios a *B. burgdorferi* en nuestro medio.

En base a lo anterior, nos planteamos la siguiente pregunta de investigación.

¿Cuál es la frecuencia de la infección por *B.burgdorferi* y su caracterización clínica en pacientes con parálisis facial en una población de pacientes derechohabientes del IMSS, de la zona sur del DF. ?

Objetivos

Objetivo general.

1. –Determinar la frecuencia de infección por *B.burgdorferi* y características clínicas de pacientes con parálisis facial aguda, en una población derechohabiente del IMSS de la Zona sur del DF.

Objetivo específico.

1. Caracterización epidemiológica y clínica de pacientes con parálisis facial infectados por *B.burgdorferi*.

Objetivos secundarios.

1. Determinar la frecuencia de infección por virus del grupo Herpes en pacientes con parálisis facial.
2. Comparar la frecuencia de infección por *B.burgdorferi* vs virus del grupo Herpes en pacientes con parálisis facial.

Justificación

La parálisis facial es la tercera causa de consulta en la Unidad de Medicina Física y Rehabilitación Siglo XXI de Villa Coapa, dado que es la forma de presentación neurológica más frecuente en Borreliosis de Lyme, esta debe ser integrada al diagnóstico diferencial de pacientes con parálisis facial aguda, donde la causa es poco clara y ofrece dificultad para el diagnóstico. Consideramos debe realizarse búsqueda intencionada de casos para lograr un diagnóstico temprano y ofrecer un tratamiento oportuno.

El estudio se realizó en un área donde previamente han sido documentados casos de neuroborreliosis, por lo que es importante la búsqueda intencionada de estos así como lograr determinar la frecuencia de parálisis facial asociada a infección por *B. burgdorferi* en nuestro medio.

Hipótesis

Hipótesis alterna: La frecuencia de infección por *B. burgdorferi* será confirmada mediante estudios serológicos en el 6% de pacientes con parálisis facial en una población derechohabiente del IMSS en la zona sur del DF.

Hipótesis nula: La frecuencia de infección por *B. burgdorferi* será confirmada mediante estudios serológicos en menos del 6% de pacientes con parálisis facial en una población derechohabiente del IMSS en la zona sur del DF.

Material y métodos

Lugar dónde se realizó el estudio.

El presente trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Investigación de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Los pacientes fueron estudiados en el Unidad de Medicina Física y Rehabilitación Siglo XXI del IMSS. Zona sur del DF.

Diseño de la investigación.

- a) Por el control de la maniobra experimental por el investigador: **Observacional.**
- b) Por la captación de la información. **Prolectivo.**
- c) Por la medición del fenómeno en el tiempo. **Comparativo.**
- d) Por ausencia de grupo control. **Descriptivo.**

Diseño del estudio.

Transversal comparativo.

Criterios de selección.**Criterios de inclusión.**

- Paciente con parálisis facial aguda con o sin otras manifestaciones sugestivas de Borreliosis de Lyme.
- Tiempo de evolución de un día hasta 8 semanas.
- En casos de pacientes diabéticos y/o hipertensos solo se incluyeron pacientes controlados que cumplan con los criterios antes mencionados.

Criterios de no inclusión.

- Antecedente clínico y/o serológico de leptospirosis, sífilis, enfermedad autoinmune, (LES, esclerosis múltiple, Artritis reumatoide.)
- Parálisis facial de etiología no infecciosa.

Criterios de eliminación.

- Cuando una vez dentro del estudio se confirme que la etiología de la parálisis es no infecciosa.
- Cuando no sea posible la toma de la segunda muestra de suero.

Tamaño de la muestra.

El tamaño de la muestra fue calculado de la siguiente manera:

La población que se va a estudiar, son los usuarios de la Unidad de Medicina Física y Rehabilitación Siglo XXI de Villa Coapa IMSS. Zona sur del DF la cuál cuenta con 2,248, 398 derechohabientes.

En México no hay estudios previos que indique la frecuencia de parálisis facial en Borreliosis de Lyme, por lo que se realizó un estudio piloto en la Unidad de Medicina Física y rehabilitación de Villa Coapa, encontrando una frecuencia del 6%. Por lo que el tamaño de la muestra fue calculado en base a una frecuencia esperada del 6%, un error aceptable del 1%, con un intervalo de confianza del 95%.

En base a lo anterior serán incluidos en el estudio un total de 191 pacientes.

Definición de caso.

- a) Paciente con parálisis facial.
- b) Con o sin otras manifestaciones de Borreliosis de Lyme.
- c) Estudios serológicos positivos (ELISA y Western-Blot) ambas IgG.
- d) Serología negativa para otras causas infecciosas de parálisis facial mediante (ELISA IgM) para *Herpes simplex tipo 1*, *Herpes simplex tipo 2*, *Citomegalovirus*, virus de *Epstein-barr*.
- e) Pacientes en quienes se descarte otra posible causa de parálisis facial no infecciosa (vascular, metabólico, neoplásico, traumático, crisis hipertensiva.)

Interpretación de estudios serológicos.

- Resultado de IgG positivo para *Borrelia burgdorferi* y anticuerpos IgM negativos para CMV, EBV, HSV-1, HSV-2. Interpretación: Como parálisis facial asociada a Borreliosis de Lyme.
- Un resultado positivo anticuerpos IgG de *B. burgdorferi* y anticuerpos IgM positivos para alguno de los otros virus estudiados. Interpretación: La probable etiología es por el agente para el cuál se hayan realizado la identificación de anticuerpos IgM.
- Un resultado negativo para IgM de *B. burgdorferi* y negativo para IgM de CMV, EBV, HSV-1, HSV-2. Interpretación: la etiología es diferente a los agentes estudiados.

En México no hay estudios previos que indique la frecuencia de parálisis facial en Borreliosis de Lyme, por lo que se realizó un estudio piloto en la Unidad de Medicina Física y rehabilitación de Villa Coapa, encontrando una frecuencia del 6%. Por lo que el tamaño de la muestra fue calculado en base a una frecuencia esperada del 6%, un error aceptable del 1%, con un intervalo de confianza del 95%.

En base a lo anterior serán incluidos en el estudio un total de 191 pacientes.

Definición de caso.

- a) Paciente con parálisis facial.
- b) Con o sin otras manifestaciones de Borreliosis de Lyme.
- c) Estudios serológicos positivos (ELISA y Western-Blot) ambas IgG.
- d) Serología negativa para otras causas infecciosas de parálisis facial mediante (ELISA IgM) para *Herpes simplex tipo 1*, *Herpes simplex tipo 2*, *Citomegalovirus*, virus de *Epstein-barr*.
- e) Pacientes en quienes se descarte otra posible causa de parálisis facial no infecciosa (vascular, metabólico, neoplásico, traumático, crisis hipertensiva.)

Interpretación de estudios serológicos.

- Resultado de IgG positivo para *Borrelia burgdorferi* y anticuerpos IgM negativos para CMV, EBV, HSV-1, HSV-2. Interpretación: Como parálisis facial asociada a Borreliosis de Lyme.
- Un resultado positivo anticuerpos IgG de *B. burgdorferi* y anticuerpos IgM positivos para alguno de los otros virus estudiados. Interpretación: La probable etiología es por el agente para el cuál se hayan realizado la identificación de anticuerpos IgM.
- Un resultado negativo para IgM de *B. burgdorferi* y negativo para IgM de CMV, EBV, HSV-1, HSV-2. Interpretación: la etiología es diferente a los agentes estudiados.

Análisis estadístico

Análisis de los datos.- Estadística descriptiva: Se utilizarán medidas de tendencia central y dispersión, para cada variable de acuerdo al nivel de medición y tipo de distribución.

Variables.

1. Parálisis facial. (variable dependiente)

Definición operativa: Afección neurológica (parálisis) del VII par craneal, uní o bilateral.

Tipo de variable: Categórica.

Escala de medición: Nominal

2. Borreliosis de Lyme (variable independiente)

Definición operativa.- Examen serológico (ELISA, confirmada mediante Western-Blot) y parálisis facial.

Tipo de variable: Categórica.

Escala de medición: Nominal.

3. *Virus de Herpes simple* tipo 1 y 2. (Variable independiente).

Definición operativa: Serología positiva para IgM de *Herpes virus simple tipo 1 y 2* y parálisis facial.

Tipo de variable: Categórica.

Escala de medición: Nominal.

4. *Citomegalovirus.* (Variable independiente)

Definición operativa. : Serología positiva para IgM de CMV y parálisis facial.

Tipo de variable: Categórica.

Escala de medición Nominal.

5. *Virus de Epstein-barr.* (Variable independiente.)

Definición operativa: Serología positiva para IgM de VEB y parálisis facial.

Tipo de variable: Categórica.

Escala de medición: Nominal.

Descripción general del estudio

El estudio se realizó en el período comprendido del 15 de Abril al 30 de Noviembre del año 2000.

Con pacientes derechohabientes de la UMFR Siglo XXI del IMSS. Zona sur del D.F.

Se colectaron datos de cada paciente através de la hoja de recolección de datos que incluyó interrogatorio sobre antecedentes epidemiológicos de importancia, manifestaciones clínicas de Borreliosis de Lyme, descripción de las características de la parálisis facial así como su evolución, e interrogatorio dirigido a factores que orienten hacia etiología diferente a Borreliosis de Lyme.

Se incluyeron pacientes con parálisis facial uni o bilateral, de etiología no conocida y que presentaron o no otras manifestaciones tempranas o tardías de Borreliosis de Lyme, con un tiempo de evolución de un día a 8 semanas de evolución en caso de pacientes diabéticos e hipertensos solo se incluyeron aquellos que se encontraban controlados y que cumplieran con los dos primeros criterios de inclusión. No se incluyeron aquellos con antecedente clínico y/o serológico de leptospirosis, sífilis, enfermedad autoinmune. Fueron eliminados aquellos pacientes que una vez dentro del estudio se haya encontrado etiología no infecciosa y en aquellos casos en que no fue posible la toma de una segunda muestra.

A los pacientes incluidos en el estudio, se les tomó 5-10ml de sangre para búsqueda de anticuerpos IgG mediante ELISA para *B. burgdorferi* y anticuerpos IgM para virus de *Herpes simplex tipos 1 y 2*, *Citomegalovirus*, *virus de Epstein-barr*. Estos últimos con el fin de descartar otras causas infecciosas de parálisis facial, realizar diagnóstico diferencial y de esta manera tener mayor apoyo en la definición de caso. Aquellos pacientes con serología positiva (ELISA) para *B. burgdorferi* se les realizó confirmación serológica mediante Western-Blot. Las causas no infecciosas más frecuentes de parálisis facial fueron descartados incluyendo pacientes hipertensos y diabéticos controlados.

A cada paciente incluido en el estudio se citó a las 4 semanas de la primer entrevista para entrega de resultados, evaluación de evolución y toma de una segunda muestra buscando seroconversión de anticuerpos en este momento de la evolución.

Cuando se confirmó la posible etiología y si el paciente requería de tratamiento este fue localizado telefónicamente y se dio seguimiento para evaluación de la respuesta al mismo.

La búsqueda de pacientes, llenado de hoja de recolección de datos, toma de muestras, procesamiento de las mismas y el seguimiento de cada caso se realizó por un residente del quinto año de infectología.

Técnicas empleadas y criterio para interpretación de resultados.

- **ELISA para *B. burgdorferi*.**- Las muestras de suero se procesaron mediante ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos IgG vs *B. burgdorferi* a una dilución de 1:640.
 - **Criterio de interpretación.** Se considera como positivo cuando se cuente con un valor por arriba del valor de corte, el cuál se determina mediante el promedio de la densidad óptica de 25 sueros negativos estudiados más tres desviaciones estándar.
 - **Western-Blot (WB).** - La banda del blot templada es utilizada para localizar e identificar bandas presentes en las tiras utilizada para la prueba de muestras específicas. Se utilizó la banda localizadora como referencia para IgG, la tira reactiva de control se utilizó como referencia.
 - Se leyeron las tiras del Western-Blot, de cada suero problema, contra los controles positivo, y débil positivo, para determinar el peso molecular de cada banda encontrada.
- Se utilizaron los siguientes criterios para interpretación. (CDC)

Positivo.	Interpretación
Con 5 de las siguientes 10 bandas:	Anticuerpos IgG significativos para
18,23,28,30,39,41,45,58,66,93kDA	detección de proteínas: presuntiva evidencia
(Criterios del CDC.)	de exposición.

Negativo: Anticuerpos IgG con menos de 5 de 10 proteínas

No leible: Sin posibilidad para la lectura de las bandas.

Criterios de EUCALB Se considera positivo cuando se encuentren 2 o más de las siguientes bandas: **83/100, 58, 43, 39, 30, 23, 21, 17kDA.**

La interpretación se realizó por dos investigadores diferentes cegados para el diagnóstico.

ELISA para HSV-1.

Se utilizó un Kit comercial de Gull ® Lab INT Salt Lake City UT, USA para detección de anticuerpos IgM.

Interpretación de resultados - Los resultados se expresan en unidades ELISA calculados de la siguiente manera

UE= Título de anticuerpos del suero problema./ Anticuerpos del suero de corte.

POSITIVO: Un cociente mayor de 1.1 indica una muestra positiva.

NEGATIVO Un valor menor de 0.9, indica una muestra negativa

EQUIVOCO Un valor entre 0.9 a 1.1 indica un resultado equivoco. Los sueros problema con este resultado deben repetirse

ELISA para HSV-2.

Se utilizó un Kit comercial marca Gull ® INT SLC UT, USA para determinación de IgM.

Interpretación de resultados.-

Positivo: Un valor igual o mayor al valor del suero de referencia.

Negativo: Un valor menor a 0.9, que se determina mediante la multiplicación del resultado del título de anticuerpos del suero problema y el del suero de referencia, un valor menor a este resultado es interpretado como negativo.

Equivoco: Un resultado entre 0.9 – X interpretado como equivoco.

ELISA para CMV/IgM.

Se utilizó un Kit comercial marca Gull ® INT SLC UT, USA para determinación de IgM.

Interpretación de resultados.

El límite menor de absorbencia para un resultado positivo es igual o mayor al suero de referencia.

El límite superior de absorbencia para un resultado negativo, se determina mediante la multiplicación del valor del suero de referencia por 0.9. Valores menores a este resultado son interpretados como negativos

Un resultado entre ambos se considera como equivoco y deberá repetirse.

ELISA para CMV/EBV IgM

Se utilizó un Kit comercial marca Gull ® INT SLC UT, USA para determinación de IgM.

Interpretación de resultados.

El límite menor de absorbencia para un resultado positivo es igual o mayor al suero de referencia.

El límite superior de absorbencia para un resultado negativo, se determina mediante la multiplicación del valor del suero de referencia por 0.9. Valores menores a este resultado son interpretados como negativos.

RESULTADOS

Se estudiaron 191 pacientes en el periodo comprendido del 15 de Abril al 15 de Noviembre del año 2000, fueron incluidos 7 casos nuevos por semana con una edad promedio de 45 ± 17 años, 89 pacientes del sexo masculino y 103 del sexo femenino, una relación M : F de 1:1.14. (TABLA 1)

La Hipertensión arterial y Diabetes Mellitus en la población estudiada de pacientes infectados y no infectados, presentaron la misma proporción de casos entre DM y HAS. Hipertensión arterial OR=1.77 IC 95% (0.57-5.44) p= NS. Diabetes Mellitus OR=0.85 IC 95% (0.24-2.91) p= NS.

El antecedente de mordedura de garrapata estuvo presente en 5 (2.6%) de los pacientes y la exposición a hospederos de la garrapata (perros, gatos, pájaros, vacas) en 103/191 (53.9%) de los casos. El tiempo de evolución al momento de la primera serología fue de una mediana de 10 días. En la primera muestra la respuesta de anticuerpos fue del 67%. A las 4 semanas se evaluó seroconversión, la cuál se presentó en el 33%, con una mediana de evolución de 24 días.

La parálisis facial unilateral se encontró en 188 pacientes, de los cuáles 95 fueron del lado derecho y 93 del lado izquierdo, hubo 3 casos de parálisis facial bilateral. En (19.3%) pacientes cursaron con parálisis facial recurrente. En 14/37 (37.8%) de los pacientes con parálisis facial recurrente se encontró agente infeccioso.

Se identificó agente etiológico en 58/191 (30.3%) de los pacientes. Fueron positivos para *B. burgdorferi* 12 (6.2%) de los casos. El 23.8% de los casos tuvieron infección para los virus del grupo Herpes (HSV-1, HSV-2, CMV, EBV). (TABLA 2)

Los pacientes infectados por *B. burgdorferi* fueron 12/191 (6.2%), con una edad promedio de 50 ± 20 años y la relación M: F de 1:1.4. El tiempo de evolución al momento del diagnóstico serológico fue de una mediana de 29 días. Los pacientes ingresaron al estudio durante las siguientes estaciones del año, primavera, verano y otoño. En primavera se presentaron 6 casos (50%), durante el verano 4 (33%) y en el otoño 2 casos (16%).

En 9 (75%) pacientes presentaron datos clínicos sugestivos de Borreliosis de Lyme como, parálisis facial recurrente (5) artritis y/o artralgiás en (4) síndrome del túnel del carpo y bloqueo aurículoventricular en (1). Solo 3 casos cursaron con parálisis facial como única manifestación. Ningún paciente presentó eritema migrans. (TABLA 3)

Se encontró un riesgo de recurrencia de parálisis facial en pacientes infectados por *B. burgdorferi* 2.93 veces mayor vs no infectados. OR= 2.93 IC95% (1.1-16.9) $p < 0.05$

Los pacientes seropositivos por ELISA IgG vs *B.burgdorferi* tuvieron en promedio 1.460 Unidades ELISA, 12 (6.2%) pacientes fueron diagnosticados como *B.burgdorferi* positivos en base a los criterios serológicos del CDC y de EUCLAB.

Las bandas encontradas con mayor frecuencia fueron la banda 41 en el 100%, la banda 45 en el 81%, las bandas 93,66 y 58 en el 72 %. (TABLA 4). De estos 12 pacientes 3 presentaron las bandas de bajo peso molecular 18, y 23 (OSPC), sugestivos de infección temprana. Estos tenían en promedio 13 días de evolución y en 9 pacientes mostraron las bandas de alto peso molecular (58,66, 93), que sugieren infección tardía, tenían en promedio de 55 días de evolución.

Los pacientes infectados por *B. burgdorferi* recibieron tratamiento con tetraciclina por 14 días. Se recuperaron 11/12 (83%) a las 8 semanas de evolución. El tiempo de recuperación de la parálisis posterior al inicio del manejo antimicrobiano con una mediana de 5 semanas.

El grupo de pacientes infectados por virus del grupo Herpes fue del 23.8%. Estos casos incluyeron el 7.8% de infectados con HSV-1, en el 9% HSV-2, CMV con 4% y EBV en el 3%. (TABLA 2). El tiempo de evolución al momento del ingreso al estudio con una mediana de 10 días. A las 4 semanas se realiza nueva serología encontrando una frecuencia de seroconversión del 33%.

Los pacientes infectados por HSV tipo 1 y 2 tuvieron una mediana de edad de 45 años, relación entre sexo M: F de 1:1.2 y tiempo de evolución al momento del diagnóstico serológico a las 4 semanas con una mediana de 29 días. Todos los pacientes seropositivos para el virus de HSV-1 fueron negativos para HSV-2, CMV y EBV. Los casos positivos para los virus de CMV y EBV no tuvieron otra manifestación clínica diferente de parálisis facial.

El tiempo promedio de recuperación de la parálisis en los pacientes infectados por virus del grupo Herpes fue a las 7 semanas del 97% de los casos, solo hubo un paciente infectado por HSV-1 que no logró tener reinervación.

En 8 (28%) de los pacientes infectados por virus de Herpes simple (tipo 1, y tipo 2) se presentaron lesiones herpéticas 4 semanas previas al inicio de la parálisis; las cuáles fueron lesiones orales en 7 pacientes infectados por HSV-1 y 1 de los pacientes positivos para HSV-2 cursó con lesiones genitales Sin encontrar diferencias entre pacientes infectados y no infectados OR 1.2 IC 95% (0.53-3.53), p= NS Se presentó parálisis facial recurrente en 9 casos y no se encontraron diferencias en la recurrencia de parálisis facial en los pacientes infectados por virus del grupo Herpes vs no infectados. OR=0.82, IC 95% (0.39-1.86) p=NS. (TABLA 5).

DISCUSION

La parálisis facial aguda tiene diferentes causas, en la mayoría de los casos la etiología no se conoce, y es entonces considerada como parálisis de Bell. *Borrelia burgdorferi* es la etiología bacteriana más frecuente en la patogenia de parálisis facial. ⁽²³⁾ En el presente trabajo se realiza diagnóstico etiológico en pacientes con diagnóstico inicial de parálisis facial aguda idiopática, donde en el 30% se identificó un agente infeccioso como posible etiología. Estos datos son iguales a los reportados por Kukimoto y cols quienes encuentran que en el 30% de los pacientes con parálisis facial idiopática se logra identificar causa infecciosa. ⁽⁵³⁾

Se confirma la presencia de infección por *B. burgdorferi* como posible etiología de parálisis facial aguda en la zona sur del DF con una frecuencia del 6.2%. Esta frecuencia es más baja a la reportada por Jonsson y cols en zonas endémicas de EUA donde encuentran el 11% de casos de parálisis facial en pacientes con Borreliosis de Lyme. ⁽²³⁾

El estudio fue realizado durante las estaciones del año donde el vector (garrapata) transmite la bacteria al hombre y se ha documentado que se presentan los cuadros de parálisis facial secundaria a *B. burgdorferi*. Shapiro y cols reportan una mayor frecuencia de aparición de esta al final de la primavera y durante el otoño (período de máxima exposición a la garrapata). ⁽²⁵⁾ Otros autores como Niemann y cols encuentran que esta frecuencia se incrementa hasta el 50% en Verano y Otoño. Halpering encuentra la mayor frecuencia de casos (10-25%) durante el Verano en áreas endémicas de EUA. ^(19,30)

En los casos estudiados se encontraron otras manifestaciones de la fase temprana diseminada de la enfermedad con sintomatología a nivel musculoesquelético, alteraciones cardíacas y manifestaciones neurológicas. Tales como parálisis facial recurrente, bloqueo aurículoventricular, artritis y síndrome del túnel del carpo.

Niemann y cols en un estudio retrospectivo de 10 años en pacientes infectados por *B. burgdorferi* que no reciben tratamiento reportan una frecuencia de parálisis facial recurrente del 12%. ⁽³⁰⁾ En este estudio encontramos una frecuencia del 41% en pacientes con Borreliosis de Lyme, dato que apoya el riesgo de recurrencia de parálisis facial en aquellos pacientes que no son tratados durante el primer evento.

El riesgo de recurrencia de parálisis facial fue 2.9 veces mayor en pacientes infectados por *B. burgdorferi* que en no infectados.

El diagnóstico de parálisis facial por *B. burgdorferi* es difícil, sin embargo hay datos clínicos y epidemiológicos que pueden sugerir la etiología, como la parálisis facial recurrente, otros datos clínicos sugestivos de Borreliosis de Lyme, su aparición durante la Primavera, Verano y Otoño, el ser residente de un área geográfica dónde previamente han sido documentados casos de Borreliosis, los antecedentes epidemiológicos de mordedura de garrapata y de eritema migrans.

Smouha y cols reportan que no siempre se cuenta con estos debido a que es posible que pasen desapercibidos por el paciente ó que el eritema migrans no sea diagnosticado por el médico en el momento de su presentación. El eritema migrans no se presenta en el 30% de los pacientes con parálisis facial ⁽²⁶⁾ Este mismo autor encuentra que la parálisis facial puede ser la única manifestación en el 20% de los pacientes con Borreliosis de Lyme. Estos resultados son semejantes a los casos en este estudio dónde el 25% de los pacientes infectados presentaron parálisis facial como única manifestación de la enfermedad.

Smouha y cols ⁽²⁶⁾ reportan una frecuencia de recuperación del 68% a las 8 semanas en pacientes que reciben tratamiento. Por otra parte Jonsson y cols ⁽²³⁾ encuentran un tiempo de recuperación de la parálisis a las 6 semanas, con un rango de tiempo de evolución hasta el momento de recuperación de (2 semanas-6 meses). En este estudio el tiempo de recuperación en pacientes que reciben tratamiento es similar al reportado por Clark y cols ⁽²⁷⁾ quienes refieren que la parálisis facial por *B. burgdorferi* tiene un excelente pronóstico independientemente de que el paciente reciba o no tratamiento, sin embargo este último debe ser administrado para prevenir las manifestaciones tardías de la enfermedad.

La frecuencia de infección por virus del grupo Herpes fue del 23.8% (VHS-1, VHS-2, CMV, EBV). El VHS se presentó en el 16.8% de los casos. Esta frecuencia en VHS-1 fue menor a la reportada por Murakami y cols, quienes reportan una prevalencia del 11%. Yasushi y cols encuentran a VHS-2 asociado en el 3% de pacientes con parálisis facial. ^(56,57) En este trabajo esta cifra fue mayor con un

9% lo que puede sugerir un cambio epidemiológico en la frecuencia de presentación así como en el sitio anatómico dónde estos agentes son comúnmente relacionados.

Es conocido el cruce antigénico que existe entre HSV-2 y otros alfa herpesvirus (HSV-1, VZV), Ohana y cols evalúan la especificidad del método comercial (Gull) utilizado en este estudio encontrando una especificidad del 93.6% para HSV-2, ⁽⁵⁷⁾ aunado a que en la muestra estudiada los pacientes con anticuerpos para alguno de los virus del grupo Herpes no presentaron dos tipos de anticuerpos positivos, lo que muestra la ausencia de cruce antigénico y apoya nuestros resultados.

Los pacientes con parálisis facial y antecedente de lesiones herpéticas orales o genitales que se presentan en las 4 semanas previo al inicio de la parálisis facial no tuvieron riesgo de que la etiología sea por virus de Herpes simple. No hubo riesgo de recurrencia de parálisis facial en los pacientes infectados por virus del grupo Herpes vs no infectados.

La frecuencia de infección por CMV fue del 4%, igual a la reportada por Kukimoto y cols, la frecuencia que encontramos para EBV (3%) es menor a la reportada por estos mismos autores quienes encuentran una frecuencia del 4% de infección por EBV asociado a parálisis facial. ⁽⁵³⁾

El tiempo de recuperación de los pacientes infectados por este grupo de agentes etiológicos es similar al encontrado por McCormick ⁽⁵⁶⁾ quién sugiere que el 50-90% de los pacientes se recuperan completamente entre 1-2 meses posterior al inicio de la parálisis.

Es importante que se sospeche etiología infecciosa por los médicos que tienen primer contacto con el paciente de parálisis facial, dónde el estudio serológico debe ser realizado en forma rutinaria en pacientes dónde exista sospecha clínica, para que se otorgue tratamiento oportuno y se eviten recurrencias del cuadro ó las manifestaciones tardías de la enfermedad.

CONCLUSIONES.

- El diagnóstico de etiología infecciosa en pacientes con parálisis facial fue similar a lo reportado en la literatura.
- Se confirma la presencia de infección por *B.burgdorferi* como posible etiología de parálisis facial en la zona sur del DF con una frecuencia del 6.2%.
- La parálisis facial asociada a infección por *B.burgdorferi* se acompañó en el 75% de los casos a manifestaciones a de Borreliosis de Lyme.
- La parálisis facial se puede presentar como única manifestación de la enfermedad en el 25% de los casos de Borreliosis de Lyme.
- El riesgo de recurrencia de la parálisis facial en pacientes infectados por *B. burgdorferi* puede ser hasta 2.9 veces mayor que en los no infectados.
- La frecuencia de infección por virus Herpes simple tipo 2 fue mayor a lo reportado. Lo que sugiere un cambio epidemiológico en la frecuencia de presentación y su localización anatómica.
- La frecuencia de infección por virus de Herpes simple tipo 1, CMV, y EBV es similar a lo reportado en la literatura.
- El tiempo de recuperación en pacientes infectados fue de 8 semanas vs 4 semanas de los no infectados. $p < 0.005$.

TABLA 1

Incidencia mensual de pacientes con parálisis facial en la UMFR SXXI y casos estudiados

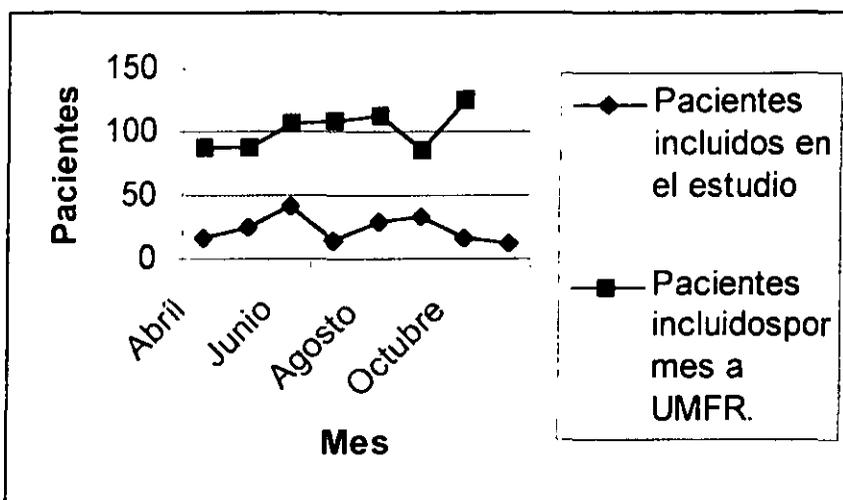


TABLA 3.

Características clínicas de pacientes con parálisis facial infectados con *B. burgdorferi*

Características clínicas	CDC	EUCALB	TOTAL
Parálisis facial recurrente	5/12 (41.3%)	2/9 (22%)	7/21 (33.3%)
Artritis, artralgiás.	4/12 (33.3%)	0	4/21 (19%)
Bloqueo AV*	1/9 (5%)	0	1/21 (4.7%)
S. del túnel del carpo	0	1/9 (5%)	1/21 (4.7%)
Eritema migrans	0	1/9 (5%)	1/9 (4.7%)
Ninguno	3/12 (25%)	6/21 (28.5%)	9/21 (42%)

* AV: Auriculoventricular.

TABLA 4.

Bandas encontradas con mayor frecuencia en el Western-Blot.

BANDA	PORCENTAJE
41	100%
45	81%
93	72%
66	72%
58	72%

TABLA 5.

Características demográficas y clínicas de *B.burgdorferi*. y VHS

Característica	<i>B.burgdorferi</i>	HSV	No infectados	Significancia estadística
Edad	Promedio:48 años	Promedio:44 años	Promedio:48 años	p = NS **
Sexo	M:F 1:1.4	M:F 1:1.2	M:F 1:1.2	
Exp a reservorio	6/12 (50%)	9/46 (19.5%)	88/133 (66%)	P = NS *
Mord garrapata	0	0	5	P = NS
T.evolución al ingreso al estudio	Promedio :25 días	Promedio:24 días	Promedio: 24 días	P = NS**
PF recurrente	5/12 ♦	6/46	23/133 ♦	OR. 2.93 IC 95% (1.1-16.9) p<0.05 * p = NS*
L herpéticas	0	5/46	20/133	
Seroconversión a las 4 sem	8.3%	33%		
Tiempo de recuperación.	Prom: 8.5 sem ♦	Promedio:8.5 sem	Promedio :4.6sem ♦	P< 0.05 **
Pacientes no recuperados	1	1	3	p=NS*

*Chi cuadrada.

** T de Students para pruebas independientes

ANEXO 1

Hoja de recolección de datos

Unidad de Investigación de enfermedades infecciosas y parasitarias. Hospital de pediatría de CMN SXXI.

FOLIO: FECHA:

NOMBRE _____ EDAD: _____
 AFILIACION _____
 OCUPACION _____ SEXO: (M) (F) DOMICILIO: _____
 TELEFONO: _____
 DIAGNOSTICO PRESUNTIVO: _____

1. - Antecedentes.

- a) ¿Ha estado en un área rural en los últimos seis meses? ? SI: _____ NO: _____
- b) Dónde: _____
- c) ¿Ha estado en un bosque o zoológico en los últimos 6 meses? ? SI: _____ NO: _____ Dónde: _____
- d) Las lesiones actuales iniciaron antes o después de estar en el área rural, bosque o zoológico SI: _____ NO: _____
- e) Convive con perros, gatos, pájaros en casa. SI: _____ NO: _____
- f) Convive con vacas en casa o trabajo. SI: _____ NO: _____
- g) ¿Ha viajado a EUA? SI: _____ NO: _____
 ¿Qué estados? _____ Mes _____ AÑO _____
- h) ¿Ha recibido mordedura de garrapata? SI: _____ NO: _____
- i) Cuando: _____
- b) ¿Tuvo lesiones en piel? SI: _____ NO: _____
- c) Tipo de lesión. Macular: (m) Papular: (p) Otras (o) Especifique: _____
- d) Forma anular: SI: _____ NO: _____
- e) Número de lesiones: _____
- f) Lesiones. A) aisladas. B) Confluente.
- g) Miden: _____ Localización: _____ a) cara (1) tronco (2) Extremidades sup (3) Extremidades inf. (4). Axilas. (5) Nuca.
- h) La lesión reaparece. SI: _____ NO: _____
- i) Cuántas ocasiones: _____
- j) Borde de la lesión. Regular. Irregular. Desconoce.
- k) Coloración del borde. Rojo. Pálido. Desconoce.
- l) Coloración del centro. Violáceo. Rojo. Rosa. Desconoce.
- m) La lesión se transformo. SI: _____ NO: _____
- a) ¿Tiene lesiones en piel? SI: _____ NO: _____

2. - Dermatológico.

3. - Articulaciones.

- a) Tiene datos articulares:
Sí: _____ NO: _____
- b) Tuvo signos articulares:
Sí: _____ NO: _____
- c) Artralgias: Sí: _____ NO: _____
- d) ¿Cuántas articulaciones son afectadas?

- e) Artritis Sí: _____ NO: _____
Tiempo de inicio de la artritis.

4. - Sistema nervioso.

- a) Tiene manifestaciones de sistema nervioso. Sí: _____ NO: _____
Cuáles: _____
- b) Tuvo manifestaciones de sistema nervioso.
Sí: _____ NO: _____
Cuáles: _____
- c) Síndrome meníngeo. (Rigidez de nuca, Kerning, Brudzinsky). Sí: _____ NO: _____

- d) Medir fuerza muscular de acuerdo a escala de I A V. _____
I: Nula II: disminución de fuerza y tono.
III: Disminución en contra de gravedad.
IV: Fuerza disminuida a fuerza opuesta no contra gravedad. V: Normal.
- e) Alteración. Simétrica. Asimétrica
- f) Sensibilidad. _____ Normal. (1)
Disminuida. (2) Aumentada. (3)
Localización. _____
- g) AFECCIÓN A ALGÚN PAR CRANEAL.
Sí: _____ NO: _____

I par II par III par IV par V par
VI par VII par VIII par IX par X par
XI par XII par

Lado afectado: Derecho Izq Zona afectada.
Comisura labial. Hemicara.

Parálisis facial: Primer cuadro Recurrente
Unilateral. Bilateral.

Tiempo de evolución. _____

Se realizó fondo de ojo: Sí _____ NO _____

Hallazgos _____

5. Cardiovascular.

- a) ¿Tiene alteraciones cardiológicas?
Sí: _____ NO: _____
- b) ¿Tuvo alteraciones cardiológicas?
Sí: _____ NO: _____
- c) Frecuencia cardiaca. _____ Normal
(1) Bradicardia (2) Taquicardia (3)
- d) Se realizó EKG. Sí: _____ NO: _____
- e) El EKG presenta intervalo P-R prolongado.
Sí: _____ NO: _____
- f) Requirió de hospitalización.
Sí: _____ NO: _____

6. - Otros.

- a) Curso con bocio: Sí _____ NO _____
- b) Presenta sobrepeso: Sí _____ NO _____
- c) Cursa con Diabetes Mellitus: Sí _____
NO _____
- d) Cursa con hipertensión arterial: Sí _____
NO _____
- e) Ha tenido exposición súbita al frío previo al inicio de su cuadro: Sí _____ NO _____
- f) Ha cursado con estrés previo al inicio de su cuadro: Sí _____ NO _____
- g) Ha cursado con otitis previo al inicio de su cuadro: Sí _____ NO _____
- h) Curso con adenomegalias: Sí _____ NO _____
- i) Curso con visceromegalias: Sí: _____
NO _____

- j) Curso con mareo: Sí _____ NO _____
- k) Curso con acúfenos: Sí _____ NO _____
- l) Curso con alteraciones auditivas: Sí _____
NO _____ Cuáles _____
- m) Tuvo varicela: Sí _____ NO _____
- n) Lesiones mucocutáneas: Sí _____
NO _____
- o) Herpes Zoster: Sí _____ NO _____
- p) Vesículas dolorosas: Sí: _____ NO: _____
- q) En que sitio: Cara Tórax Abdomen
Extremidades
- r) Vesículas en genitales: Sí _____ NO _____
- s) Tiempo de evolución:

- t) La presenta actualmente: Sí _____ NO _____

IgE. Sí: _____ NO: _____
Positivo: _____ Negativo: _____

BHC : Sí: _____ NO: _____

Resultado.- HB: _____ Leucocitos _____

Segmentados _____% Linfocitos _____%
Monocitos _____% Eosinófilos _____%
Basófilos _____%

Plaquetas _____ Glucosa _____

¿Se realizó LCR? Sí _____ NO _____

Número de células _____% PMN _____
MN _____ Glucosa _____ mg/dl
Proteínas _____ mg/dl. Cloruros _____
mg/dl Tinción de Gram _____

Se sugiere solicitar T3 y T4. (De contar con resultado favor de anotar.) En caso de sospecha de enfermedad tiroidea

T3 _____ T4 _____

Medicamentos administrados. Nombre, dosis y tiempo de administración.

7. - Estudios de laboratorio.

VDRL., Sí: _____ NO: _____
Positivo: _____ Negativo: _____

Factor reumatoide. Sí: _____ NO: _____
Positivo: _____ Negativo: _____

Acs antinucleares. Sí: _____ NO: _____
Positivo: _____ Negativo: _____

IgG Sí: _____ NO: _____
Positivo: _____ Negativo: _____

IgM. Sí: _____ NO: _____
Positivo: _____ Negativo: _____

Hoja de consentimiento informado

Título de la investigación: "Frecuencia de Infección por *Borrelia burgdorferi* y caracterización clínica en pacientes con parálisis facial en población derechohabiente del IMSS. Zona Sur del Distrito Federal".

Investigadores: Dra. Ma Gpe Gordillo Pérez.

Dr. Fortino Solórzano Santos.

Dra. Ireni García Juárez.

La parálisis facial es causada por procesos infecciosos, diabetes mellitus, e hipertensión arterial. Dentro de las causas infecciosas las más frecuentes son por procesos virales y por la bacteria *Borrelia burgdorferi*. La Borreliosis de Lyme es una enfermedad que produce manifestaciones en piel, corazón, articulaciones y Sistema nervioso (Parálisis facial). De recibir tratamiento se pueden evitar las manifestaciones tardías de la enfermedad.

Objetivo: Determinar la frecuencia de infección por *B. burgdorferi* en pacientes con parálisis facial, caracterización clínica en una población derechohabiente del IMSS. Zona sur del DF.

PROCEDIMIENTO:

Si consiento participar sucederá lo siguiente:

1. Responderé a preguntas sobre mi historia médica que dura 30 minutos.
2. Me someteré a una exploración física rutinaria y revisarán mi expediente.
3. Me extraerán sangre (5-10 ml) aproximadamente del brazo con aguja, para estudios serológicos para detectar infección por *B. burgdorferi* y descartar infecciones virales. La punción duele unos segundos y en ocasiones se produce un hematoma (moretón) pero es poco frecuente.

BENEFICIOS: Conocer los resultados de los estudios y el diagnóstico de su enfermedad.

CONFIDENCIALIDAD:

Los resultados de todas las pruebas se discutirán conmigo y se enviarán a mi médico tratante. Toda la información será confidencial y será usada solo para efectos de la investigación. Mi identidad será mantenida confidencial en la medida que la ley lo permita.

DERECHO A REHUSAR O ABANDONAR EL ESTUDIO.

Mi participación en el estudio es enteramente voluntaria y soy libre de rehusar a tomar parte o abandonarlo en cualquier momento, sin afectar mi atención médica futura.

La Dra. Ireni García Juárez y/o colaboradores, ha discutido esta información y se ha ofrecido a responder mis preguntas. Si tengo más preguntas, puedo ponerme en contacto con ella directamente en el servicio de Infectología del Hospital de Pediatría del CMN SXXI.

CONSENTIMIENTO.

Consiento en participar en este estudio, he tenido la oportunidad de leerlo.

NOMBRE Y FIRMA: _____

TESTIGO (Nombre y Firma): _____

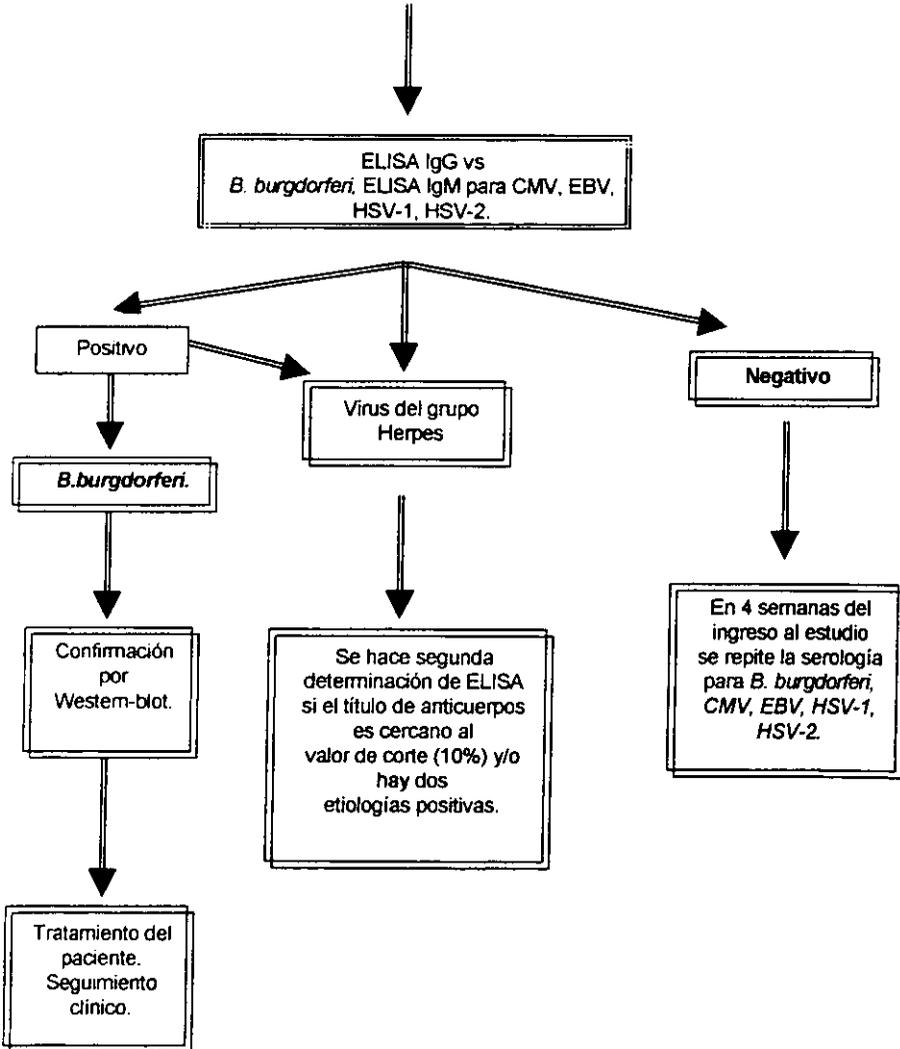
FECHA: _____

Firma del Médico _____

ANEXO 3

Flujograma de actividades

Parálisis facial de etiología no conocida.



HOSPITAL DE PEDIATRIA. CMN SXXI

UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y PARASITARIAS.

PROYECTO: "Frecuencia de Infección por *Borrelia burgdorferi* en pacientes con parálisis facial, en población derechohabiente del IMSS. Zona sur del Distrito Federal".

Folio: _____ Fecha: _____

Nombre: _____

Afiliación: _____

RESULTADOS.

ELISA para *Borrelia burgdorferi*. _____

ELISA para virus de *Herpes simple tipo 1*. _____

ELISA para virus de *Herpes simple tipo 2*. _____

ELISA para *Citomegalovirus* _____

ELISA para virus de *Epstein- barr* _____

RESPONSABLE DEL RESULTADO: _____

Anexo 5

Técnicas de laboratorio

Inmunoensayo-enzimático IgG vs *Borrelia burgdorferi*

Para buscar anticuerpos contra extracto total se utilizó un sonicado obtenido de la cepa B31 de *Borrelia burgdorferi* proporcionada por el Dr. Alan G Barbour (Department of Microbiology of the University of Texas Health Science Center at San Antonio Texas). El antígeno se ajusta a una concentración de 5 mg/ml y será almacenado a - 70 °C hasta su uso.

La técnica se realizó de la siguiente manera:

El valor de corte de la dilución en suero fue de 1:640 como valor de corte de seropositividad para incrementar la especificidad sin modificar la sensibilidad del ensayo; con esta dilución el 9% de los sueros es positivo. El valor de corte se definió como el promedio de más de 3 desviaciones estándar del control negativo. En cada placa se probaron los sueros problema y se incluyó un pool positivo y un pool negativo. El resultado se calculó dividiendo el promedio de la absorbancia de la muestra problema entre el valor de corte expresado como unidades ELISA, de tal manera que los resultados mayores de 1.0 se consideran como positivos.

Para medir anticuerpos contra este antígeno se utilizó el procedimiento descrito por Engvall y Perlmann; el antígeno se diluyó en solución reguladora de fosfatos (pH 9.6) y se adicionó a placas de 96 pozos (Combiplate 8; Labsystem, Finlandia) agregando 0.5 µg/pozo y fue incubado toda la noche. Después se bloqueó la superficie con leche descremada al 5% con solución reguladora de fosfatos (PBS 1 X) y la placa fue incubada por 75 minutos a 37 °C enseguida se lavó 3 veces con solución reguladora de fosfatos con Tween 20 al 0.05% (PBS TG) y fueron agregados los sueros problema. En cada placa se incluyeron por cuadruplicado un pool de sueros positivos y un pool de sueros negativos para corregir la variación del ensayo por día y por placa.

Las placas se incubaron por una hora a 37 °C, enseguida se agregó un anticuerpo monoclonal anti IgG o anti IgA humano acoplado con fosfatasa alcalina (Southern Biotech EUA) a una dilución 1:1000 e incubado una hora a 37 °C. Se agregó sustrato pNPP (Southern Biotech EUA) a una concentración de 1 mg/ml diluido en regulador de dietanolamina pH 9.8, las placas se incubaron a 37 °C por una hora. La absorbancia fue leída a 405 nm en un lector IEMS analyzer (Labisystem, Finlandia).

Técnica para Western-Blot IgG vs *B. burgdorferi*

- **Western-Blot (WB).** - La banda del blot templada es utilizada para localizar e identificar bandas presentes en las tiras utilizada para la prueba de muestras específicas, Se utilizó la banda localizadora como referencia para IgG.
- Se leyeron las tiras del Western-Blot, de cada suero problema, contra los controles positivo, y débil positivo, para determinar el peso molecular de cada banda encontrada.

Se utilizaron los siguientes criterios para interpretación. (CDC)

Positivo.

Con 5 de las siguientes 10 bandas:
18,23,28,30,39,41,45,58,66,93kDA

Reporte.

Anticuerpos IgG significativos para
detección de proteínas; presuntiva evidencia
de exposición.

EUCALB: Se considera positivo cuando se encuentren 2 o más de las siguientes bandas: **83/ 100, 58, 43, 39, 30, 23, 21, 17kDA.**

Negativo. Anticuerpos IgG con menos de 5 de 10 proteínas. Detectadas de *B. burgdorferi*, ó sin anticuerpos. Cuando aparezcan bandas específicas para las proteínas de *B. burgdorferi*.

La interpretación se realizó por dos investigadores diferentes cegados para el diagnóstico.

Técnica de inmunoensayo-enzimático IgM Anti-HSV-1

Principio del método.

Se utilizó un kit comercial, de Biomedix marca Gull ® Lab INT Salt Lake City UT, USA. Los anticuerpos IgM específicos contra el virus del herpes simple existentes en la muestra a investigar, se enlazan con el antígeno en los pocillos de reacción de la placa de la prueba. A este anticuerpo específico se une el conjugado Anti-IgM humana.

Procedimiento.

- Se determinó el número de pocillos necesarios para cada placa (cantidad de muestras a investigar, el control positivo, control negativo, referencia.)
- Se adicionó 100µl de los sueros problema, diluidos y controles (positivo, negativo, y de corte) a sus respectivos pozos.
- Se incubó a 37 °C en cámara húmeda por 60 min.
- Al final la incubación fueron lavados, con solución de lavado incluida, mediante llenado y decantación en cinco ocasiones.
- Se colocaron 100µl de conjugado diluido en cada pozo.
- Incubar nuevamente a 37°C en cámara húmeda por 60 min.
- Lavado.

- Se adicionó a cada pozo 100µl de sustrato, y se incubará nuevamente en oscuridad 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se detuvo la reacción con 100µl de solución de stop.
- Se dio lectura a la absorbancia con 450nm contra blanco de aire en los primeros 10 minutos

Interpretación de resultados:

Se calculó el índice de anticuerpos: absorbancia del suero problema/ absorbancia de suero de corte.

POSITIVO: Resultado mayor a 1.1.

NEGATIVO: Resultado menor de 0.9.

Un valor entre el positivo y negativo, es considerado como equivoco y deberá repetirse la muestra.

Técnica de inmunoenzayo-enzimático Anti HSV-2/IgM

Se utilizó un kit comercial de Gull ® Lab INT Salt Lake City UT, USA Anti-HSV-2/IgM.

Procedimiento.

- Una vez determinada la cantidad de pozos a utilizar, se reservaron tres de ellos para control positivo, control negativo, y suero de referencia.
- Se realizó dilución de los controles, de los sueros problema, con la solución diluyente en proporción 1:1 (15µl de solución diluyente, y 150µl de suero problema y controles.)
- Las muestras fueron incubadas a 37°C por 30 minutos.

- Fueron lavados con la solución de lavado incluida 5 veces en lavador automático.
- Se adicionó 100 μ l de solución de conjugado a cada pozo.
- Incubación nuevamente por 30 minutos a 37°C
- Lavado.
- Se adicionó a cada pozo 100 μ l de solución de paranitrofenilfosfato.
- Detención de la reacción
- Se realizó lectura de la placa con 405nm dentro de la primer hora.

Interpretación de resultados:

Límite menor de absorbancia para resultados positivos: igual al valor del suero de referencia.

Límite superior de absorbancia para resultados negativos: se determina mediante la multiplicación del valor del suero de referencia por 0.9.

Un resultado entre los dos valores anteriores se consideró como equivoco y fue repetido.

Técnica de inmunoensayo-enzimático Anti-EBV-Virus/IgM

Principio del método.

La IgM contenida en la muestra a investigar se fija al antígeno del virus depositado sobre la superficie plástica de la placa de prueba. El conjugado anti IgM humana se fija a este complejo. La parte enzimática del conjugado transforma la solución de cromógeno (TMB+ peróxido de hidrógeno) dando una coloración azul. Esta reacción se interrumpe por la adición de solución de parada originándose una coloración amarilla cuya intensidad mide 450nm. La IgM dirigida contra los antígenos celulares es indicada de la misma manera en el pocillo recubierto con antígeno de control.

El valor obtenido para la diferencia de intensidad cromática de una muestra a investigar, en un pocillo recubierto con antígeno y en otro con antígeno de control, es una medida del contenido y de la reactividad inmunoquímica de los anticuerpos de EBV detectados.

Procedimiento.

Se utilizó un kit comercial de Gull © Lab INT Salt Lake City UT, USA Anti-EBV/IgM.

- **Plan de distribución:** Se comprobó la cantidad necesaria de pocillos (cantidad de muestras a investigar + cantidad de determinaciones con los patrones de referencia P/N ó P/P) El patrón de referencia P/N se colocó una vez como control negativo al comienzo de la serie a investigar (pocillos B1-B2) y última muestra de la serie a investigar y en series muy grandes, en cada placa de prueba.
- **Distribución de las muestras:** En cada uno de los primeros pocillos recubiertos con antígeno (Ag) o con antígeno de control (AgCo), según el plan de distribución se pipetearon 0.15ml de los patrones de referencia P/N ó P/P prediluidos. Con ello la dilución de la prueba fue de 1:21.

- **Incubación:** Se cubrió con una lámina adhesiva las placas de la prueba, ya listas y a más tardar 15 minutos después de terminada la distribución de las muestras se incubaron durante 60min a 37°C.
- **Lavado:** Se retiró la lámina adhesiva; se colocó en cada pocillo aproximadamente 0.3ml de solución de lavado POD diluida, dejando actuar 1-2 minutos. Se repetirá el procedimiento dos veces más.
- **Distribución del conjugado:** Se Colocó en cada pocillo 0.1ml de la dilución lista para el uso del conjugado Anti-IgM humana.
- **Incubación del conjugado:** Se cubrió la placa con una nueva lámina adhesiva, incubación durante 60min a 37° C.
- **Lavado.**
- **Distribución del sustrato:** se Agregó a cada pocillo 0.1ml de solución del cromógeno.

- Se cubrió con una nueva lámina adhesiva e incubar durante 30min entre 18 y 25°C al abrigo de la luz.
- **Reacción de parada:** Se retiró la lámina adhesiva y se agregará a cada pocillo 0.1ml de solución de parada.
- **Lectura:** Al término de 30 minutos a una longitud de onda de 450nm

Técnica de Inmunoensayo -enzimático para CMV/IgM

Se utilizó un kit comercial de Gull ® Lab INT Salt Lake City UT, USA Anti-CMV/IgM.

1. Diluir el suero del paciente, y de los controles (positivo, negativo, y referencia) a dilución 1:11 la solución diluyente.
2. Agregar 100µl de suero diluido a cada pozo.
3. Incubar a 37° C durante 30 minutos.
4. Lavar con solución de lavado 3 veces con lavado manual, con lavador automático lavar por cinco ocasiones
5. Adicionar 100µl de conjugado a cada pozo,
6. Incubar por 30 minutos a 37°C
7. Lavar
8. Adicionar 100µL de conjugado con p-NPP a cada pozo.
9. Incubar por 30 min a 37°C.
10. Adicionar con una pipeta multicanal 100µl de solución para detener la reacción.
11. Lectura de valores de absorbancia a 405nm dentro de la primer hora.

Interpretación de resultados.

Límite menor de absorbancia: para resultados positivos es igual al valor de absorbancia para el suero de referencia (x). Valores >x son considerados como positivos.

Límite superior de absorbancia: para resultados negativos (β) este valor se determina mediante la multiplicación de $X \times 0.9$. Los valores de absorbancia $< \beta$ son considerados como negativos.

Los resultados con valores entre x y β son considerados como equivoco y las muestras fueron repetidas.

REFERENCIAS.

1. Sood KS. *Lyme disease*. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18:913-25.
2. Centers for Disease Control and Prevention. *Lyme disease*. (<http://www.cdc.gov/ncidod/dybid/dvbid.htm>)
3. Campbell GL, Fritz LC, Fish D, et al. *Estimation of the Incidence of Lyme Disease*. *Am J Epidemiol* 1998; 148:1018-26.
4. Water PH, Wiske B, Weber K. " *Lyme Borreliosis: basic science and clinical aspect.* " *Lancet* 1994; 343:1013-16.
5. CDC. *Lyme disease in the United States*. *MMWR* 1996; 46:531-35.
6. Barbour GA, Durland F. *The Biological and Social Phenomenon of Lyme Disease*. *Science* 1993; 260:1610-16.
7. Steere CA. *Lyme disease: A growing threat to urban populations*. *Proc.Nat.Acad. Sci* 1994; 91:2378-83.
8. Ostfeld SR. *The ecology of Lyme -Disease risk*. *Am Sci* 1997; 85:338-46.
9. Arroyave MC, Tamez-González R. *Enfermedad de Lyme. Informe de dos casos*. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1994; 51:117-120.
10. Vargas HM. *Enfermedad de Lyme en México*. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1994; 51:811.
11. Gordillo GP, Torres J, Solorzano SF, et al. *Serologic Evidences Suggesting the Presence of Borrelia burgdorferi Infection in Mexico*. *Arch Med Research* 1999; 30:64-8.
12. Gordillo PG, Solórzano SF, Torres LJ et al. *Confirmación de neuroborreliosis de Lyme por métodos serológicos y moleculares en el Valle de México*. Los Cabos BC; Congreso de Neurología 1999.
13. Williams LC, Strobino B, Lee A, et al. *Lyme disease in childhood: clinical and epidemiologic features of ninety cases*. *Pediatr Infect Dis J* 1990; 9:10-4.
14. CDC. *Case definitions for infectious conditions under public health surveillance*. *MMWR* 1997; 46 (RR-10): 20.
15. CDC. *Case definition of Lyme borreliosis for Surveillance and reporting systems in the United States of America*. *MMWR* 1990; 93 (RR-11): 17-18.

16. Stanek G, O'Connell S, Cimmino M et al. *European Union Concerted action on risk assessment in Lyme borreliosis: clinical case definitions for Lyme borreliosis*. Wien Klin Wochenschr 1996; 108:741-47.
17. Steere AC, Grodzicki LR, Komblatt NA et al. *The spirochetal etiology of Lyme disease*. N Engl J Med 1983; 308:733-39.
18. Pachner AR, Steere AC. *The triad of neurologic manifestations of Lyme disease*. Neurology 1985; 35:47-53.
19. Halperin JJ, Little WB, Coyle KP et al. *Lyme disease: Cause of a treatable peripheral neuropathy*. Neurology 1987; 37:1700-06
20. Feder MH, Zalneratis LE, Reink L et al. *Lyme Disease: Acute Focal Meningoencephalitis in a Child*. Pediatrics 1988; 82:931-34.
21. Belman LA, Lerr M, Coyle KP et al. *Neurologic manifestations in children with Nort American Lyme disease*. Neurology 1993; 43: 2609-14.
22. Christen JH, Bartlau N, Efferit H et al. *Peripheral facial palsy in childhood-Lyme Borreliosis to be suspect unless proven Otherwise*. Acta Paediatr Scand. 1990; 79:1219-1224.
23. Jonsson L, Stiernsteidt G, Thomander L. *Tick-Borne Borrelia Infection in Patients With Bell's palsy*. Arch Otolaryngol Head and Neck Surg 1987; 113:303-6.
24. Halperin JJ, Golightly M. *Lyme borreliosis in Bell's palsy*. Neurology 1992; 42:1268-70.
25. Shapiro DE, Gerber AM. *Lyme Disease and Facial Nerve Palsy*. Arch Pediatr Adolesc Med 1997; 151:1183-4
26. Smoutha EE, Coyle KP, Shukri S. *Facial Nerve Palsy in Lyme Disease: Evaluation of Clinical Diagnostic Criteria*. AM J Otol 1997; 18:257-261.
27. Clark RJ, Carlson DR, Sasaki TC et al. *Facial paralysis in Lyme Disease*. Laryngoscope 1985; 95:1341-45.
28. Bloom JB, Wyckoff MP, Meissner CH et al *Neurocognitive abnormalities in Children after classic manifestations of Lyme Disease*. Pediatr Infect Dis J 1998; 17:89-96.
29. Adams VW, Rose DC, Eppes CS et al. *Cognitive Effects of Lyme Disease in Children*. Pediatrics 1994; 94:185-9.

- 30 Niemann G, Koksai AM, Oberle A, et al. *Facial palsy and Lyme Borreliosis: Long-term follow-up of Children with antibioticly untrated "idiopathic" facial palsy.* Klin Padiatr 1997; 209:95-99.
- 31 Sigal HL. *Pitfalls in the diagnostic and Management of Lyme Disease.* Arthritis and Rheumatism 1998 41 195-204
- 32 Steere CA, Berardi PV, Weeks EK et al. *Evaluation of the Intrathecal Antibody Response to Borrelia burgdorferi as a Diagnostic Test for Lyme Neuroborreliosis.* J Inf Dis 1990; 161:1203-9
- 33 Misonne MC, Hoet PP. *Species-Specific Plasmid Sequences for PCR Identification of the Tree Species of Borrelia burgdorferi Sensu Lato Involved in Lyme Disease.* J Clin Microbiol 1998; 36 270-72.
- 34 Zbinden R, Goldenberger D, Lucchini MG et al. *Comparison of Two Methods for Detecting Intrathecal Syntesis of Borrelia burgdorferi-Specific Antibodies and PCR for Diagnosis of Lyme Neuroborreliosis.* J Clin Microbiol 1994; 32:1795-98.
- 35 Dupuis M, Luyasu V, Warscotte L et al. *Lyme disease and facial palsy without pleocytosis.* Neurology 1998; 51:58.
- 36 Albsettu M, Schaer G, Good M et al. *Diagnostic value of cerebrospinal fluid examination in children with peripheral facial palsy and suspected Lyme borreliosis.* Neurology 1997; 49:817-24
- 37 Belman LA, Reynolds L, Preston T et al. *Cerebrospinal Fluid Findings in Children with Lyme Disease- Associated Facial Nerve Palsy.* Arch Pediatr Adolesc 1997; 151:1224-28.
- 38 Albsettu M, Schaer G, Good M et al. *Diagnostic value of cerebrospinal fluid Examination in children with peripheral facial palsy and suspected Lyme boreliosis.* Neurology 1997; 49:817-24.
- 39 Nocton JJ, Bradley JB, Rutledge JB et al. *Detection of Borrelia burgdorferi DNA by Polymerase Chain Reaction in Cerebrospinal Fluid in Lyme Neuroborreliosis.* J Inf Dis 1996; 174:623-7.
- 40 Bingham MP, Galetta LS, Athreya B. *Neurologic Manifestations in Children With Lyme Disease.* Pediatrics 1995; 96:1053-56.

41. Balcer JL, Winterkorn MS, Galetta LS. *Neuro-ophthalmic Manifestations of Lyme Disease*. J Neuro-Ophthalmol 1997; 17:108-21.
42. Furtan LS, Maraspin V, Ruzic-Sabljic E et al. *Lyme borreliosis and peripheral facial palsy*. Wien Klin Wochenschr 1999;111:970-975.
43. Ledue BT, Collins FM, Craig W. *New Laboratory Guidelines for serological Diagnosis of Lyme Disease: Evaluation of the Two – test Protocol*. J Clin Microb 1996; 34:2343-50.
44. Hauser U, Lehnert G, Wilske B. *Validity of Interpretation Criteria for Standardized Western Blot (Immunoblot) for Serodiagnosis of Lyme Borreliosis Based on Sera Collected throughout Europe*. J Clin Microb 1999; 37:2241-47.
45. Tilton CR, Sand NM, Manak M. *The Western Immunoblot for Lyme Disease: Determination of Sensitivity, Specificity, and Interpretive Criteria with Use Commercially Available Performance Panels*. Clin Inf Dis (Suppl)1997; 25: 31-4.
46. Dressler F, Whalen AF, Reinhardt NB. *Western Blotting in the Serodiagnosis of Lyme Disease*. J Inf Dis 1993; 167:392-400.
47. Magnarelli AL, Miller NJ, Anderson FJ et al. *Cross-Reactivity of Nonspecific Treponemal Antibody in Serologic Test for Lyme Disease*. J Clin Microb 1990; 28:1276-79.
48. Hauser U, Lehnert G, Lobentanzer R et al. *Interpretation Criteria for Standardized Western Blot for Three European Species of Borrelia burgdorferi Sensu Lato*. J.Clin. Microbiol 1997;35:1433-1444.
49. Carbajal LJ, Devesa GI, González FE. *Identificación de factores de riesgo en el desarrollo de parálisis facial idiopática (o de Bell) en población derechohabiente del IMSS. XI Jornadas Médicas de Residentes en Epidemiología y Salud Pública*. México DF; 1999. P 5-8.
50. Morgan M, Nathwani D. *Facial Palsy and Infection; The Unfolding Story*. Clin Inf Dis 1992; 14:263-71.
51. Gilden HD, Kleinschmidt BK, La Guardia JJ et al. *Neurologic complications of the Reactivation of Varicella-Zoster Virus*. N Engl J Med 2000; 342:635-44.
52. Inamura H, Aoyagui M, Tojima H et al. *Viral Infection in acute peripheral facial palsy Investigation in Yamagata prefecture*. Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl 1988; 448:23-26.

53. Kukimoto N, Ikeda M, Yamada K. ***Viral infections in acute peripheral facial paralysis Nationwide Analysis centering on CF.*** Acta Otolaryngol (Stockh) 1988;446:17-22.
54. Devniese PP. ***Bell Palsy and Herpes Simplex Virus.*** Ann Int Med 1996; 125:698.
55. Murakami S, Mizobuchi M, Nkashiro Y, et al. ***Bell Palsy and Herpes simplex Virus: Identification of viral DNA in Endoneurial Fluid and Muscle.*** Ann Intern Med 1996; 124:27-30.
56. Mc Cormick DP. ***Herpes simplex virus as a cause of Bell's palsy.*** The Lancet 1972;29:937-939.
57. Yasushi F, Ohtani F, Kawabata et al. ***High Prevalence of Varicella-Zoster Virus Reactivation in Herpes simplex Virus-Seronegative Patients with Acute Perioheral Facial Palsy.*** Clin Inf Dis 2000;30:529-533.
58. Ohana B, Lipson M, Vered N et al. ***Novel Approach for Specific Detection of Herpes Simplex Virus Typo 1 y 2 Antibodies and Inmunoglobulin G and M Antibodies.*** Clin, Diag. Lab. Immunol 2000;7:904-908.