

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/13704185>

A comparative study of western blot interpretation criteria for Lyme disease serological diagnosis in our environment

Article in *Anales de Medicina Interna* · February 1998

Source: PubMed

CITATIONS

4

READS

72

5 authors, including:



José Gutiérrez-Fernández
University of Granada

472 PUBLICATIONS 3,984 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Miguel Guerrero Fernandez
Hospital Regional Universitario de Málaga

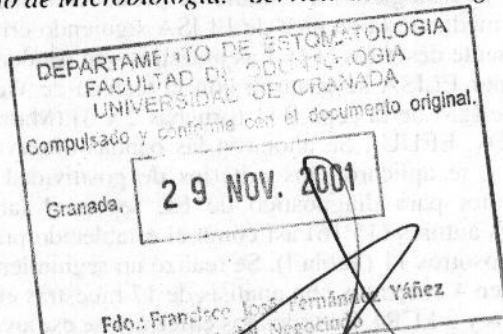
22 PUBLICATIONS 60 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Rentabilidad comparada de los criterios de interpretación del Western-blot para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Lyme en nuestro medio

F. NUÑEZ MURILLO, J. GUTIERREZ FERNANDEZ, M. GUERRERO FERNANDEZ*, G. PIEDROLA ANGULO, C. MAROTO VELA

Departamento de Microbiología. *Servicio de Neurología. Hospital Universitario San Cecilio. Universidad de Granada. Granada



A COMPARATIVE STUDY OF WESTERN-BLOT INTERPRETATION CRITERIA FOR LYME DISEASE SEROLOGICAL DIAGNOSIS IN OUR ENVIRONMENT

RESUMEN

Se estudia la rentabilidad diagnóstica en nuestro medio de la serología para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme (EL) mediante la interpretación del Western-blot.

Se analizaron 25 muestras (20 sueros y 5 líquidos cefalorraquídeos. LCR) pertenecientes a 5 enfermos con EL según criterios del CDC. En todos ellos se excluyó la sífilis. Se investigó la presencia de anticuerpos (Acs) anti- *Borrelia burgdorferi* en suero mediante una técnica de ELISA indirecto (IgG+IgM; cepa B31). En los enfermos con procesos neurológicos se estudió en LCR la producción intratecal de Acs. A las muestras que resultaron positivas por ELISA se les realizó la técnica de Western-blot para la misma cepa. Se siguieron los criterios de positividad del Western-blot para EL establecidos por el fabricante, Tilton, Dressler y la presencia de una de las bandas de 93, 39, 34, ó 23 Kda para IgG.

De 4 enfermos controlados serológicamente, uno (25%) serorvirtió. En tres, con manifestaciones neurológicas, se demostró producción intratecal de Acs. La capacidad del Western-blot para detectar EL según los criterios del fabricante, Tilton, Dressler y la presencia de algunas de las cuatro bandas de IgG fue del 26,31%, 42,1%, 21% y 84,2%, respectivamente, para la IgG y del 52,6%, 47,36% y 42,1%, respectivamente, para la IgM.

Los criterios establecidos por Tilton y Dressler pueden no tener una rentabilidad diagnóstica adecuada en nuestro medio; la presencia de una de las bandas de 93, 39, 34 ó 23 Kda de IgG tuvo una mayor sensibilidad diagnóstica.

PALABRAS CLAVE: *Borrelia burgdorferi*. Enfermedad de Lyme. Anticuerpos. Western-blot.

ABSTRACT

We have studied the WB reliability for the Lyme disease (LD) serological diagnosis.

Twenty five samples (20 sera and 5 CSF) from 5 patients with LD, according to CDC criteria were analyzed. The syphilis was excluded in every patient. *Borrelia burgdorferi* antibodies were assessed by an indirect ELISA (IgG + IgM, B31 strain). Intrathecal antibodies in CSF were studied in patients with neurological diseases. Positive samples by ELISA were reanalyzed by WB according to the manufacturer, Tilton and Dressler criteria and presence either 93, 39, 34 or 23 kDa band for IgG.

Four patients were controlled and one of them (25%) became negative the antibodies (seroreversion). Three of them, who had neurological symptoms, displayed intrathecal antibodies. WB sensibility for LD according to the manufacturer, Tilton, Dressler and any of the four IgG bands was 26,31%, 42,1%, 21% and 84% for IgG and 52,6%, 47,3% and 42,1% for IgM respectively.

Tilton and Dressler criteria may not be as sensible as 93, 39, 34 or 23 kDa IgG bands for the diagnosis of LD in our environment.

KEY WORDS: *Borrelia burgdorferi*. Lyme disease. Antibodies. Western-blot.

Núñez Murillo F, Gutiérrez Fernández J, Guerrero Fernández M, Piédrola Angulo G, Maroto Vela C. Rentabilidad comparada de los criterios de interpretación del Western-blot para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Lyme en nuestro medio. An Med Interna (Madrid) 1998; 15: 8-12.

INTRODUCCION

La interpretación de la serología frente a *Borrelia burgdorferi* es difícil; en numerosas publicaciones se recoge la incertidumbre que produce no disponer de criterios clínicos y/o de laboratorio que tengan la sensibilidad y especificidad

Trabajo aceptado: 30 de Julio de 1997.

Correspondencia: Dr. J. Gutiérrez. C/ Camino Bajo de Huétor 84. 1º A. 18008 Granada. E-mail: JOSEGF@GOLIAT.URG.ES.

necesaria para el diagnóstico de enfermedad de Lyme (EL) (1). El serodiagnóstico con los métodos disponibles es muy complicado por las reacciones compartidas de polipéptidos espiroquetales con otros antígenos (2,3), el retraso en el desarrollo de la respuesta inmune humoral (4), el efecto supresor en esta respuesta de una terapia antimicrobiana temprana (5) o por la formación de inmunocomplejos (6).

En los últimos años se ha propuesto la reacción en cadena de la polimerasa como técnica para detectar ADN de *B.*

burgdorferi en distintos productos patológicos. Su sensibilidad varía en función de los cebadores utilizados, de la genoespecie de *B. burgdorferi* prevalente en el área geográfica, de las manifestaciones clínicas y de las características de la técnica empleada. Tampoco está exenta de falsos positivos o negativos (7). Se trata pues de una enfermedad de complejidad diagnóstica. En este trabajo se quiere realizar aportaciones sobre la rentabilidad comparada de los criterios de interpretación del Western-blot para el diagnóstico serológico de la EL en nuestro medio.

MATERIAL Y METODOS

Se analizaron 25 muestras (19 sueros y 6 líquidos cefalorraquídeos, LCR) de 5 enfermos con EL, según criterios ya establecidos (8,9), tres de los cuales comunicados previamente a la comunidad científica (10,12).

Enferma n.º 1 (10): Niña de 11 años sin antecedentes de picadura de garrapata. Presentó lesión de *eritema migrans* y bloqueo aurículo-ventricular de II grado con respuesta clínica satisfactoria al tratamiento con doxiciclina.

Enferma n.º 2: Mujer de 50 años con antecedente de picadura de garrapata. Presentó mielorradiculitis con síntesis intratecal de anticuerpos (Acs). Tuvo buena respuesta clínica al tratamiento con ceftriaxona. Posteriormente desarrolló una miopatía inespecífica y elevación persistente de velocidad de sedimentación eritrocitaria.

Enfermo n.º 3: Varón de 45 años con antecedentes de picadura de insecto y que recibió tratamiento antimicrobiano desconocido. En el momento de hacer el diagnóstico había transcurrido 6 meses y presentó bloqueo sinusal que necesitó el uso de marcapasos. Desarrolló una meningoencefalitis con síntesis intratecal de Acs. Tuvo buena respuesta inicial al tratamiento con ceftriaxona. Presentó recidivas con afectación neurológica que respondieron al tratamiento con ceftriaxona, sola o asociada a corticosteroides.

Enfermo n.º 4 (11): Mujer de 15 años con antecedentes de picadura de garrapata que desarrolló una poliartitis simétrica bilateral. Tuvo buena respuesta inicial al tratamiento con ceftriaxona aunque hubo recidiva de artritis.

Enfermo n.º 5 (12): Mujer de 25 años con antecedentes de picadura de garrapata y fiebre. Desarrolló una insuficiencia cardíaca así como meningoencefalitis con síntesis intratecal de Acs. Tuvo buena respuesta inicial al tratamiento con ceftriaxona aunque hubo recidivas de fiebre, sin focalidad, que respondieron al uso de ceftriaxona. Lleva asintomática 4 años.

Los Acs anti-*B. burgdorferi* se determinaron mediante una prueba de ELISA indirecto (Platelia Lyme, Pasteur-Sanofi, Francia) (prueba 1) que detecta Acs IgG+IgM frente a la cepa B31. Se consideró positivo valores de absorbencia superiores al 80% del punto de corte obtenido en el ensayo de la técnica (13). En los enfermos con cuadros neurológicos se estudió la producción intratecal de Acs mediante la técnica de ELISA siguiendo criterios previamente descritos (14). Las muestras que resultaron positivas por ELISA se testaron con la técnica de Western-blot IgG e IgM de la cepa B31 (pruebas 2 y 3) (Marblot Lyme, MarDx, EEUU). Se anotaron las bandas observadas en el blot y se aplicaron los criterios de positividad del Western-blot para diagnóstico de EL según el fabricante y varios autores (15,16) así como el establecido previamente por nosotros 11 (Tabla I). Se realizó un seguimiento serológico en 4 enfermos con análisis de 17 muestras en total (14 sueros y 3 LCR). En todos los enfermos se excluyó la infección por *Treponema pallidum* mediante la prueba de hemaglutinación (Cellognost-Syphilis H, Behringwerke, Alemania).

RESULTADOS

En la Tabla II se exponen los resultados obtenidos en la serología frente a *B. burgdorferi* cepa B31. En todos los casos los Acs anti-*T. pallidum* fueron negativos. De los 4 enfermos seguidos, uno de ellos (enfermo n.º 1), serorrevirtió y solo hizo IgM. En la enferma n.º 2 una de las muestras de LCR resultó negativa coincidiendo con la administración de antibióticos. En el enfermo n.º 3 siempre se detectó una baja tasa de anticuerpos.

TABLA I
CRITERIOS DE POSITIVIDAD DE LAS BANDAS OBSERVADAS EN EL WESTERN-BLOT IgG DE *B. BURGENDORFERI sensu stricto*

Resultados		Western-Blot IgG	Western-Blot IgM
Fabricante	Positivo	5 Bandas de la 18, 23, 28, 30,31, 34, 39, 41, 45, 58, 66, 93	23 ó 37 con una de 18, 23, 31, 34, 39, 41 ó 93
	Negativo	4 bandas o menos	Patrón distinto del anterior
Nuñez y cols (17)	Positivo	1 banda de la 93, 39, 34 ó 23	No información
	Negativo	→ Patrón distinto del anterior	No información
Tilton y cols (15)	Positivo	31 ó 34 y 41 ó 39/23 y 31, 34,39 ó 41/31 y 34 con cualquier otra banda	Igual que para IgG
	Negativo	41, 66, 60 ó ausencia de bandas	Igual que para IgG
	Dudoso	Otra combinación distinta a la anterior	Igual que para IgG
Dressler y cols (16)	Positivo	5 bandas de la 18, 21, 28, 30, 39, 41, 45, 58, 66, 93	2 bandas de la 18, 21, 28, 37, 41, 45, 58, 93
	Negativo	Otra combinación distinta a la anterior	Otra combinación a la anterior

Bandas de 93, 66, 60, 58, 45, 41, 39, 37, 34, 31, 30, 28, 23, 21 y 18 Kda.

TABLA II

RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS CINCO ENFERMOS. EN LAS PRUEBAS DE SELECCIÓN Y CONFIRMACIÓN PARA *B. BURGENDORFERI* CEPA B31

Pruebas para borreliosis de Lyme			
Sujetos Muestras	Selección	Confirmación	
	Prueba 1	Prueba 2 (bandas IgG)	Prueba 3 (bandas IgM)
1.1	2	—	66. 60. 41. 34. 31. 23
1.2	2	—	66. 60. 41. 34. 31. 23
1.3	< 0,8	ND	ND
2.1	2.09	93. 66. 60. 41. 39. 34. 31. 23. 21	93. 66. 60. 41. 39. 34. 31. 23. 21
2.2*	1,45	34	—
2.3	1,15	41	41
2.4*	< 0,8	ND	ND
2.5	1,45	93. 66. 60. 41. 34. 18	41
2.6	1,12	93. 60. 41. 31. 18	66. 41. 23. 45. 18
2.7	1,23	66. 41. 34. 18	41
2.8	0,8	93. 60. 41. 34. 18	93. 41. 23
2.9*	0,8	93. 41. 34	93. 41. 23
2.10	1,46	41. 34	93. 41. 23
2.11	2,12	93. 66. 60. 41. 39. 34	93. 66. 60. 41. 34. 23. 18
2.12	1,38	60. 41. 34	66. 45. 41. 23. 18
3.1	0,8	93. 41	—
3.2	0,82	93. 66	—
3.3	0,8	93. 66. 41	—
3.4*	< 0,8	ND	ND
3.5*	0,8	93. 66. 41	—
3.6	0,9	93. 66. 41	93. 41. 39
4.1	2	93. 66. 58. 41. 39. 34. 21. 18	41. 39
4.2	3	93. 66. 58. 41. 39. 21	41. 39
5.1	3	23	41. 39. 23
5.2*	1	60. 41. 39. 18	23

*Muestra de líquido cefalorraquídeo. ND: determinación no realizada.

Las Tablas III y IV reflejan la frecuencia de las IgG e IgM, frente a proteínas específicas de la cepa B31, que se obtuvieron en las primeras muestras de suero con las que se hizo el diagnóstico de la EL. Cuando se analizan todas las muestras de suero la rentabilidad del Western-blot para detectar EL, según los criterios del fabricante, Tilton, Dressler y el nuestro, fue del 26,3%, 42,1%, 21% y 84,2%, respectivamente, para IgG; y del 52,6%, 47,4% y 42,1%, respectivamente, para IgM.

TABLA III

FRECUENCIA DE POSITIVIDAD DE IgG EN SUERO FRENTE A PROTEÍNAS ESPECÍFICAS EN EL WESTERN-BLOT EN LOS ENFERMOS ESTUDIADOS

Clínica*	Proteínas										
	93	66	60	58	41	39	34	31	23	21	18 (—)
A: 3	2	2	2		3	2	1	1	2	1	1
B: 1											1
C: 1	1	1		1	1	1	1			1	1
Total	3	3	2	1	4	3	2	1	2	2	1
(%)	(60)	(60)	(40)	(20)	(80)	(60)	(40)	(20)	(40)	(40)	(20)

*A: Procesos neurológicos; B: Procesos dermatológicos; C: Procesos reumáticos.

TABLA IV

FRECUENCIA DE POSITIVIDAD DE IgM EN SUERO FRENTE A PROTEÍNAS ESPECÍFICAS EN EL WESTERN-BLOT EN LOS ENFERMOS ESTUDIADOS

Clínica*	Proteínas									
	93	66	60	58	41	39	34	31	23	21
A: 3	2	1	1		3	3	1		3	1
B: 1		1	1		1		1	1	1	
C: 1				1	1	1		1		
Total	2	2	2	1	5	4	2	2	4	1
(%)	(40)	(40)	(40)	(20)	(100)	(80)	(40)	(40)	(80)	(20)

*A: Procesos neurológicos; B: Procesos dermatológicos; C: Procesos reumáticos.

La figura 1 refleja el comportamiento de cada muestra de suero y LCR según los criterios de positividad del Western-blot IgG para el diagnóstico de EL. Mediante nuestro criterio, se detectaron como positivas para EL todas las primeras y segundas muestras de suero, incluido el enfermo n° 3.

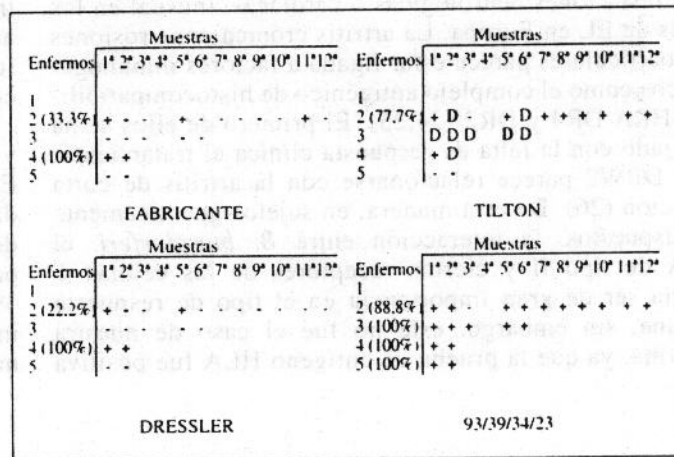


Fig. 1. Interpretación de los resultados obtenidos en el Western-blot de las muestras estudiadas según los diferentes criterios. En negrita se indica las muestras que fueron de LCR. Los huecos corresponden a muestras donde la prueba de ELISA fue negativa. D: dudoso.

DISCUSION

El diagnóstico de EL es clínico y se apoya en la investigación de los Acs específicos. Actualmente, ésta representa la principal forma de realizar el diagnóstico de laboratorio de la infección, o enfermedad por *B. burgdorferi*, por su mayor sensibilidad en comparación a otras pruebas de laboratorio (18); a pesar de ello, el diagnóstico de certeza de esta última por el laboratorio es un problema pendiente.

La sensibilidad y especificidad de las técnicas de detección de anticuerpos es variable (19-22). Se han propuesto diversos criterios de interpretación del Western-blot para diagnosticar EL (15,17). En la práctica, los criterios que no requieren la presencia de bandas de localización concreta o la existencia de un número mínimo de éstas se asocian con numerosos falsos posi-

vos. En este trabajo, cuando se refiere a las bandas de IgG, se obtiene un mayor número de diagnósticos de EL (84,2%) cuando se aplica nuestro criterio (11) (bandas de 93, 39, 34 ó 23 Kda), en comparación a los de Tilton (15) y Dressler (16). Porcentaje que se podría haber elevado si uno de nuestros enfermos hubiera desarrollado IgG (enfermo n.º 1). No se han estudiado las bandas debidas a los Acs IgM porque están influenciadas por problemas de falsos positivos en situaciones de estímulos clonales inespecíficos de linfocitos S22 y factor reumatoide, así como de falsos negativos por ausencia de IgM.

En la enferma n.º 1 (Tabla II) hubo buena respuesta clínica al tratamiento, con desaparición de Acs específicos, hecho descrito para las fases precoces de la enfermedad (23). Posiblemente, la precocidad en la investigación de anticuerpos y la realización de tandas de tratamiento, de forma precoz y reiterada, justifican que no se detectara IgG en el Western-blot y la negativización del ELISA en la última determinación. La enferma con la artritis (enferma n.º 4) es interesante por dos razones: 1) la enfermedad adoptó la forma de poliartritis bilateral crónica simétrica, con erosiones osteoarticulares semejantes a las encontradas en la artritis reumatoide; y 2) la falta de manifestaciones neurológicas o cardíacas, inusual en los casos de EL en Europa. La artritis crónica con erosiones osteoarticulares parece estar ligada a factores inmunogenéticos como el complejo antigénico de histocompatibilidad HLA DR4 y DR2 (24,25). El primero de ellos se ha asociado con la falta de respuesta clínica al tratamiento, y el DRW2 parece relacionarse con la artritis de corta duración (26). De esta manera, en sujetos genéticamente predispuestos, la interacción entre *B. burgdorferi*, el HLA de tipo II y ciertos receptores de las células T podría ser de gran importancia en el tipo de respuesta inmune, sin embargo, este no fue el caso de nuestra enferma, ya que la prueba de antígeno HLA fue positiva

para A1, B8, CW2, DR5 y DQW2. Aunque los fenómenos autoinmunes parecen participar en las reacciones séricas compartidas entre epitopos comunes de este microorganismo y proteínas del huésped (27) se desconoce si la patogénesis de la artritis inflamatoria es debida a infección persistente o a la activación de células T en el lugar de la inflamación. El tratamiento de la artritis en fases no iniciales de la EL suele ser difícil (28); así, en esta enferma, el tratamiento inicial con tetraciclinas y penicilina G, se tuvo que sustituir por ceftriaxona con excelente respuesta clínica, al menos inicialmente.

Los tres enfermos con manifestaciones neurológicas tenían un LCR inflamatorio (pleocitosis linfocitaria, aumento de proteínas y glucosa normal). La pleocitosis linfocitaria puede ser clave en el diagnóstico de la enfermedad, aunque se ha señalado que no se encuentra en todos los casos (29). La evidencia serológica de infección neurológica en nuestros enfermos fue clara, con presencia de Acs en LCR en los tres. En el enfermo n.º 3 se detectó una baja tasa de Acs en todas las determinaciones analíticas realizadas, fenómeno descrito por algunos autores (6,30,32), que se puede deber a la formación de inmunocomplejos o al hecho de que este enfermo fue sometido a tratamiento con corticoides que alteran la respuesta de anticuerpos. El tratamiento administrado en estos casos fue ceftriaxona con buena respuesta clínica, aunque en dos enfermos (n.º 3 y 5) fue necesario retratamiento.

En conclusión, es probable que los criterios de Tilton y Dressler, propuestos para el diagnóstico serológico de EL en los enfermos americanos, no tengan una rentabilidad diagnóstica adecuada en nuestro medio. El criterio de interpretación del Western-blot IgG que se propone para el diagnóstico de EL (alguna de las bandas de 93, 39, 34 ó 23 Kda) aunque debe ser evaluado por otros investigadores, puede ser un criterio más útil en nuestro medio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Steere AC, Taylor E, McHugh GL, Logigian EL. The overdiagnosis of Lyme disease. *JAMA* 1993; 269: 1812-5.
2. Barbour AG, Hayes SF, Heiland RA, Schrupf ME, Tessier SL. A *Borrelia* genus-specific monoclonal antibody binds to a flagellar epitope. *Infect Immun* 1986; 52: 549-54.
3. Luft BJ, Dunn JJ, Dattwyler RJ, Gorgone G, Gorevic PD, Schubach WH. Cross-reactive antigenic domains of the surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Res Microbiol* 1991; 144-251.
4. Craft JE, Grodzicki RL, Steere AC. The antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnosis test. *J Infect Dis* 1984; 149: 789-95.
5. Berardi VE, Weeks KS, Steere AC. Serodiagnosis of early Lyme disease: analysis of IgM and IgG antibody responses by using an antibody-capture enzyme-immunoassay. *J Infect Dis* 1988; 158: 754-60.
6. Schutzer SE, Coyle PK, Belman A, Golightly MG, Druble J. Sequestration of antibody to *Borrelia burgdorferi* in immunocomplexes in seronegative Lyme disease. *Lancet* 1990; 335: 312-5.
7. Gutiérrez J, Rodríguez M, Maroto C. Applications of PCR to diagnose Lyme borreliosis. *Serodiagn Immunother Dis* 1995; 7: 107-25.
8. CDC. Case definition for public health surveillance. *MMWR* 1990; 39: 19-21.
9. Grupo de trabajo en borreliosis de Lyme. Borreliosis de Lyme: criterios diagnósticos. *Enfermd Infecc Microbiol Clin* 1994; 12:420.
10. Gutiérrez J, Núñez F, Uvilla N, Maroto C. Borreliosis de Lyme en el niño: doble infección o evolución atípica. *Med Clin (Barc)* 1995; 7: 107-108.
11. Gutiérrez J, Palermo M, Maroto MC, Abellán M. Atypical bilateral symmetric erosive chronic polyarthritis in the course of Lyme disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12: 787-89.
12. Cantero J, Diez A, Santos JL, Aguilar JL, Ramos A. Lyme disease associated with hemophagocytic syndrome. *Clin Investig* 1993; 71:620.
13. ASTPHLD & CDC. Second National Conference on Serologic diagnosis of Lyme disease. Dearborn, Michigan, 1994.
14. Gutiérrez J, Maroto MC, De la Higuera A, Guerrero M, Padilla E, Piédrola G. Three-year study of antibody to *Borrelia burgdorferi* in southern Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 542-6.
15. Tilton RC, Ryan RW. The laboratory diagnosis of Lyme disease. *J Clin Immunol* 1993; 16: 208-14.
16. Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC. Western-blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J Infect Dis* 1993; 167: 392-400.
17. Núñez F, Gutiérrez J, Rodríguez M, Pardal JM, Rodríguez MJ, Maroto C, Piédrola G. Diagnóstico de la enfermedad de Lyme mediante la investigación de anticuerpos IgG. III Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas. Alcalá de Henares, 1995.

18. Gutiérrez J, Rodríguez MA, Maroto C. Diagnóstico microbiológico de la enfermedad de Lyme: del análisis serológico a la detección de ácidos nucleicos. *An Med Interna (Madrid)* 1994; 11: 209-11.
19. López-Prieto, Borobio MV. Prevalencia de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* en la población de Sevilla. *Enferm Infect Microbiol Clin* 1989; 7: 489-90.
20. Oteo JA, Martínez de la Artola V, Fernández JL. Prevalencia de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* en una población de riesgo. *Rev Clin Esp* 1990; 187: 215-7.
21. Russel H, Sampson JS, Schmid GP, Wilkinson HW, Plikaytis B. Enzymelinked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay for Lyme disease. *J Infect Dis* 1984; 149: 465-70.
22. Grodzicki RL, Steere AC. Diagnosing early Lyme disease by immunoblotting: comparison of immunoblotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay using different antigen preparations for diagnosing early Lyme disease. *J Infect Dis* 1988; 157: 790-7.
23. Gutiérrez J, Maroto C. False positive antibodies to *Borrelia burgdorferi* in infections by herpes virus. *Biomed Let* 1995; 52: 33-5.
24. Aguero-Rosenfeld ME, Nowakowski J, McKenna DF, Carbonaro CA, Wormser GP. Serodiagnosis in early Lyme disease. *J Clin Microbiol* 1992; 31: 3090-5.
25. Steere AC, Gibotsky A, Patarroyo ME, Winchester RJ, Hardin JA, Malavista SE. Chronic Lyme arthritis. Clinical and immunogenetic differentiation from rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 1979; 90: 896-901.
26. Lawson JP, Steere AC. Lyme arthritis: radiologic findings. *Radiology* 1985; 154: 37-43.
27. Steere AC, Dwyer E, Winchester RJ. Association of chronic Lyme arthritis with HLA-DR4 and HLA-DR2 alleles. *N Engl J Med* 1990; 323: 219-23.
28. Fikrig E, Berland R, Chen N, Williams S, Sigal LH, Flavell raz. Serologic response to the *Borrelia burgdorferi* flagellin demonstrates an epitope common to a neuroblastoma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 183-7.
29. Dattwyler RJ, Volkman DJ, Halperin JJ, Luft BJ. Treatment of late Lyme borreliosis randomised comparison of ceftriaxone and penicillin. *Lancet* 1988; 1: 1191-4.
30. Logigian EL, Kaplan RF, Steere AC. Chronic neurologic manifestations of Lyme disease. *N Engl J Med* 1990; 323: 1438-44.
31. Liegner KB. Lyme disease: the sensible pursuit of answers. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1961-3.
32. Dattwyler RJ, Yockan DJ, Luft BJ. Seronegative Lyme disease. Dissociation of specific T and B lymphocyte responses to *Borrelia burgdorferi*. *N Engl J Med* 1988; 319: 1441-6.
32. Dressler F, Yoshinari NH, Steere AC. The T-cell proliferative assay in the diagnosis of Lyme disease. *Ann Intern Med* 1991; 115: 533-9.