



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0101067
(43) 공개일자 2013년09월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/563 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7010849
(22) 출원일자(국제) 2011년09월27일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2013년04월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/053359
(87) 국제공개번호 WO 2012/047607
국제공개일자 2012년04월12일
(30) 우선권주장
61/386,694 2010년09월27일 미국(US)

(71) 출원인
코넬 유니버시티
미국 뉴욕 14850 이타카 슈트 310 파인트리로드
395, 코넬 센터 포 테크놀로지, 엔터프라이즈 앤
커머셜리제이션("씨씨티이씨")
(72) 발명자
와그너 베티나
미국 뉴욕 14850 이타카 웨스트 저지 힐 로드 180
(74) 대리인
송봉식, 정삼영

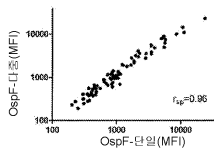
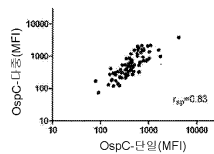
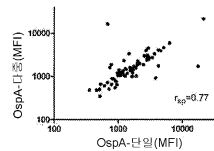
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 라임병의 진단 방법

(57) 요약

포유류에서 라임병 상태의 진단 방법을 제공한다. 방법은 포유류에서 얻거나 유래된 생물학적 샘플에서 보렐리아 부르그도르페리(비.부르그도르페리) 외부 표면 단백질(Osp) OspA, OspC 및 OspF의 항체를 결정하는 것을 수반한다. OspA, OspC 및 OspF 항체를 결정하는 것에 기초하여, 포유류는 비.부르그도르페리에 백신된 것, 비백신된 것, 감염된 것, 비감염된 것으로 진단될 수 있다. 또한, 초기, 중간 또는 만성 비.부르그도르페리 감염을 가지는 포유류를 확인할 수 있다. 방법은 특히 말과 개 사용에서 적합하다. 분리된 또는 재조합체 비.부르그도르페리 항원 및 그것을 포함한 조성물도 또한 제공된다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

포유류에서 라임병 상태의 진단 방법으로서, 포유류에서 얻거나 유래된 생물학적 샘플에서, 보렐리아 부르그도르페리(비.부르그도르페리) 외부 표면 단백질(Osp) OspA, OspC 및 OspF에 대한 항체의 존재 또는 부재를 결정하는 단계, 및 항체의 존재 또는 부재에 기초하여 비.부르그도르페리에 감염되거나 비감염된 포유류를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 포유류는 개 또는 말인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 방법으로 결정된 비.부르그도르페리 항원에 대한 항체는 단지 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF에 대한 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 포유류는 OspA, OspC 및 OspF 항원에 대한 항체의 부재를 결정함으로써 비.부르그도르페리에 감염되지 않은 것으로 확인되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 항체의 존재 또는 부재 결정에 기초하여, 동물이 초기, 중간 또는 만성 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것을 결정하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 항체의 존재 또는 부재 결정에 기초하여, 포유류가 비.부르그도르페리에 대하여 백신되었는지를 결정하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 항체의 존재 또는 부재 결정이 측면 유동 장치를 사용하여 결정되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 항체의 존재 또는 부재의 결정이 형광 비드-기반 다중 분석을 사용하여 결정되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

포유류에서 라임병 상태의 진단 방법으로서, 포유류에서 얻거나 유래된 생물학적 샘플에서, 보렐리아 부르그도르페리(비.부르그도르페리) 외부 표면 단백질(Osp) OspA, OspC 및 OspF에 대한 항체의 시험 수준을 결정하는 단계, OspA, OspC 및 OspF 항체의 시험 수준을 기준과의 비교에 기초하여 비.부르그도르페리에 대하여 백신된 것으로서 및/또는 초기, 중간 또는 만성 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것으로서 포유류를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 방법으로 결정된 비.부르그도르페리 단백질에 대한 항체는 단지 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF에 대한 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, 포유류는 OspA, OspC 및 OspF 단백질에 대한 항체의 부재를 결정함으로써 비.부르그도르페리

에 감염되지 않는 것으로 확인되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 10항에 있어서, 항체의 존재 또는 부재의 결정이 형광 비드-기반 다중 분석을 사용하여 결정되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 10항에 있어서, 기준은 중앙 형광 강도에 대한 값들의 범위인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

포유류에서 라임병 상태의 진단 방법으로서, 포유류에서 얻거나 유래된 생물학적 샘플에서, 보렐리아 부르그도르페리(비.부르그도르페리) 외부 표면 단백질 (Osp) OspA, OspC 및 OspF에 특이적인 항체의 존재 또는 부재를 결정하는 단계, 및:

- i) OspA에 대한 항체의 존재와 OspC 또는 OspF에 대한 항체의 부재를 결정하는 것에 기초하여 비.부르그도르페리에 대하여 백신되었으나 이것에 의해 감염되지는 않은 것으로서 포유류를 확인하거나;
- ii) OspC에 대한 항체의 존재와 OspA와 OspF에 대한 항체의 부재를 결정하는 것에 기초하여 초기 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것으로서 포유류를 확인하거나;
- iii) OspF에 대한 항체의 존재와 OspA와 OspC에 대한 항체의 부재를 결정하는 것에 기초하여 만성 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것으로서 포유류를 확인하거나;
- iv) OspA와 OspC에 대한 항체의 존재와 OspF에 대한 항체의 부재를 결정하는 것에 기초하여 비.부르그도르페리에 대하여 백신되고 초기 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것으로서 포유류를 확인하거나;
- v) OspA와 OspF에 대한 항체의 존재와 OspC에 대한 항체의 부재를 결정하는 것에 기초하여 비.부르그도르페리에 대하여 백신되고 만성 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것으로서 포유류를 확인하거나;
- vi) OspC와 OspF에 대한 항체의 존재와 OspA에 대한 항체의 부재를 결정하는 것에 기초하여 중간 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것으로서 포유류를 확인하거나; 또는
- vii) OspC, OspF 및 OspA에 대한 항체의 존재를 결정하는 것에 기초하여 비.부르그도르페리 감염에 대하여 백신된 적이 있고 중간 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것으로서 포유류를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19의 서열을 포함하는 분리된 단백질, 또는 상기 단백질의 조합을 포함하는 조성물.

청구항 16

제 15항에 있어서, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 및 SEQ ID NO: 17을 포함하는 단백질의 조합을 포함하는 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 라임병의 진단에 관련되고, 더 구체적으로 말 및 개와 같은 포유류에서 라임병의 여러 시기를 결정하는 것과 관련된다.

[0002] 관련 출원의 상호 참조

[0003] 본 출원은 2010년 9월 27일자 출원된 미국 출원 제61/386,694호의 우선권을 주장하며, 이것은 본원에 참고자료

로 포함된다.

배경 기술

[0004] 라임병은 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*) senso lato 그룹의 스피로헤타로 감염에 의해 야기된다. 이것은 인간, 개, 말 및 다른 포유류 중에 영향을 미치는 인수공통질병이다. 박테리아는 감염된 진드기(*Ixodes spp.*)에 의해 포유류 숙주에 전파된다. 라임병은 미국, 유럽 및 아시아에서 가장 통상적인 벡터-매개 질병이다. 유럽 및 아시아에서 질병은 통상적으로 비.가리니(*B.garinii*) 및 비.아프젤리(*B.afzelii*)에 의해 야기되는 한편, 미국에서는 비.부르그도르페리(*B.burgdorferi*) senso stricto 군주가 존재한다. 최근 라임병의 진단 방법에서는 병원체에 노출되었고 질병 발병의 위험에 있는 개와 말을 확인하기 위하여 전체 비.부르그도르페리 용해물에 대한 혈청 항체 또는 스피로헤타의 개개 항원에 대한 혈청 항체가 통상적으로 분석된다. 개와 말에서, 비.부르그도르페리의 혈청 항체의 검출은 ELISA에 이어서 웨스턴 블라팅(WB)에 의해 수행될 수 있고, 이것은 부적당한 과정인데 그럼에도 불구하고 여전히 인간 라임병 진단을 위한 황금률로 생각되고 있다. 그러한 시험이 유용한 반면에(개와 말에 대한 비.부르그도르페리의 변이성 표면 항원 VlsE의 불변 도메인 IR6를 검출하기 위한 스냅 시험과 같은 것), 그것은 바람직한 단계의 감도를 결핍하고 질병의 여러 시기들 간에 구별할 수 없다. 따라서, 본원에 말과 개를 포함하지만 반드시 이것으로 제한되지 않는 포유류에서 라임병을 진단하는 개선된 방법을 위한 진행중인 충족되지 않은 필요가 있다. 본 발명은 이것과 다른 필요를 충족시킨다.

발명의 내용

[0005] 본 발명은 포유류에서 라임병 상태의 진단 방법을 제공한다. 방법은 포유류에서 얻거나 유래된 생물학적 샘플에서, 보렐리아 부르그도르페리(비.부르그도르페리) 외부 표면 단백질(Osp) OspA, OspC 및 OspF에 대한 항체의 존재 또는 부재를 결정하는 단계, 및 항체의 존재 또는 부재에 기초하여 비.부르그도르페리에 감염되거나 비감염된 포유류를 확인하는 단계를 포함한다. 방법은 동물이 비.부르그도르페리에 대하여 백신되었는지 안되었는지를 결정하는 단계를 포함한다. 방법은 항체의 존재 또는 부재 결정에 기초하여, 라임병의 여러 시기 즉, 초기, 중간 또는 만성 비.부르그도르페리 감염 간에 식별하는 것을 허용한다. 한 구체예에서, 포유류는 OspA, OspC 및 OspF 항원에 대한 항체의 부재를 결정함으로써 비.부르그도르페리에 감염되지 않은 것으로 확인된다. 한 구체예에서, 방법으로 결정된 비.부르그도르페리 항원에 대한 항체는 단지 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF에 대한 항체이다.

[0006] 방법은 어떤 적합한 시스템 또는 장치를 사용하여 항체의 존재 또는 부재를 결정하는데 적합하다. 다양한 구체예에서, 항체는 측면 유동 장치 또는 형광 비드-기반 다중 분석을 사용하여 결정된다.

[0007] 본 발명은 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF에 대한 항체의 시험 수준을 결정하고, OspA, OspC 및 OspF 항체의 시험 수준을 기준과의 비교에 기초하여, 비.부르그도르페리에 대하여 백신된 것으로서 및/또는 초기, 중간 또는 만성 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것으로서 포유류를 확인하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 기준은 중앙 형광 강도에 대한 값들의 범위이다.

[0008] 발명의 구체적인 양태에서, 방법은

[0009] i) OspA에 대한 항체의 존재와 OspC 또는 OspF에 대한 항체의 부재를 결정하는 것에 기초하여 비.부르그도르페리에 대하여 백신되었으나 이것에 의해 감염되지는 않은 것으로서 포유류를 확인하는 것;

[0010] ii) OspC에 대한 항체의 존재와 OspA와 OspF에 대한 항체의 부재를 결정하는 것에 기초하여 초기 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것으로서 포유류를 확인하는 것;

[0011] iii) OspF에 대한 항체의 존재와 OspA와 OspC에 대한 항체의 부재를 결정하는 것에 기초하여 만성 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것으로서 포유류를 확인하는 것;

[0012] iv) OspA와 OspC에 대한 항체의 존재와 OspF에 대한 항체의 부재를 결정하는 것에 기초하여 비.부르그도르페리에 대하여 백신되고 초기 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것으로서 포유류를 확인하는 것;

[0013] v) OspA와 OspF에 대한 항체의 존재와 OspC에 대한 항체의 부재를 결정하는 것에 기초하여 비.부르그도르페리에 대하여 백신되고 만성 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것으로서 포유류를 확인하는 것;

[0014] vi) OspC와 OspF에 대한 항체의 존재와 OspA에 대한 항체의 부재를 결정하는 것에 기초하여 중간 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것으로서 포유류를 확인하는 것; 또는

- [0015] vii) OspC, OspF 및 OspA에 대한 항체의 존재를 결정하는 것에 기초하여 비.부르그도르페리 감염에 대하여 백신 된 적이 있고 중간 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것으로서 포유류를 확인하는 것을 포함한다.
- [0016] 비.부르그도르페리 단백질을 포함하는 새로운 분리된 단백질 및 그것들을 코딩하는 분리된 핵산을 포함하는 조성물 및 키트도 또한 포함된다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1 : 정제된 재조합체 비.부르그도르페리 OspA(A), OspC(B) 및 OspF(C) 단백질 및 면역블라팅에 의해 백신되거나 감염된 개로부터의 혈청을 사용한 그것의 검출. 왼쪽 패널 : 재조합체 단백질은 환원 조건 하에 15% SDS-PAGE에 의해 분리되고 쿠마시브릴리언트블루로 염색되었다(1 = 분자량 마커; 2 = 정제된 재조합체 비.부르그도르페리 단백질). 오른쪽 패널 : 단백질을 그 다음 WB에 의해 폴리비닐리딘 플로라이드(PVDF) 멤브레인에 옮기고, 종래의 전체 비.부르그도르페리 세포 용해물 WB에서 사전 시험한 개의 혈청과 배양하였다(3 = 양성 혈청; 4 = 음성 혈청).
- 도 2 : 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF 항원에 대한 혈청 항체 분석을 위한 단일(단일 비드 분석) 및 다중 분석 결과의 상관관계. 총 79개의 개 혈청이 비교용으로 사용되었다. 데이터는 표 3에서 결정된 음성(백색 원), 불분명(회색 원), 양성(흑색 원) 해석 범위에 따라 색-코드화되었다. 스피어만 순위 상관 관계를 항원들 각각에 대해 계산하였다. MFI = 중앙 형광 강도.
- 도 3 : 개 혈청에서 비.부르그도르페리에 대한 항체 검출을 위한 종래의 WB. 전체 비.부르그도르페리 세포 용해물은 환원 조건 하에 12% SDS 겔에서 분리되었다. 단백질은 WB에 의해 옮겨졌다. 블랏 멤브레인은 5% 우유로 차단시킨 다음에 다른 개 혈청과 배양되었다. 2차 퍼옥시다제 접합된 항-개 면역글로블린 항체를 검출 및 이어서 색조생산성 기판을 위해 사용하였다. 레인 1 = 분자량 마커; 레인 2 = 감염된 개로부터의 혈청; 레인 3 = 백신된 개로부터의 혈청; 레인 4 = 음성 개 혈청. 가는 화살표는 각각 22, 28, 29, 30, 및 39 kDa의 감염을 가리키는 단백질을 지적한다. 굵은 화살표는 개의 백신접종을 확인하는 31kDa 단백질을 보여준다.
- 도 4 : 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF 항원에 대한 WB 결과(전체 박테리아 용해물) 및 다중 분석의 비교. 총 188개 개의 혈청이 WB에 의해 시험되었고 각 항원에 대해 WB 음성(neg) 또는 WB 양성(pos)으로 그룹지어졌다. WB neg 및 WB pos 그룹에 대한 다중 분석 결과는 만-휘트니 시험을 사용하여 비교하였다. MFI = 중앙 형광 물질 강도.
- 도 5 : 다중 분석에 의한 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF 항원에 대한 혈청 항체의 검출을 위한 리시버 작동 곡선(ROC). 다중 분석 결과를 각 항원에 대해 WB에 의해 검출된 대응하는 비.부르그도르페리 단백질에 대한 혈청 항체의 존재 또는 부재와 비교하였다. 188개 개의 혈청 샘플로부터 결과를 각 ROC 곡선에 대해 비교하였다. 곡선(굵은 선) 아래 영역은 OspA에 대해 0.93, OspC에 대해 0.82 및 OspF에 대해 0.89이었다. 점찍어진 곡선은 95% 신뢰 간격을 보여주었다. (화살표는 굵은 선을 보여주고; 굵은 선을 감싸는 2개의 선 = '점찍어진' 선이다.)
- 도 6 : 웨스턴 블라팅에 의한 비.부르그도르페리 단백질의 검출을 위한 말 혈청에서 항체 분석. 비.부르그도르페리 전체 세포 용해물은 SDS-PAGE에 의해 분리되었고 단백질은 웨스턴 블라팅에 의해 니트로셀룰로스 멤브레인에 옮겨졌다. 레인(1)은 분자량 마커를 보여준다. 나머지 레인은 (2) 비.부르그도르페리에 감염된 말로부터의 혈청, (3) 비감염 말의 혈청, 또는 (4) 라임병에 대해 백신된 말로부터의 혈청으로 염색되었다. 감염 및 백신된 말로부터의 혈청은 특징적인 검출 패턴을 나타낸다. OspC, OspF에 대한 항체 및 또한 28, 30 및 39 kDa 항원은 감염의 지표인 한편, OspA는 백신된 말의 마커인 것으로 생각된다.
- 도 7 : 81개 말 혈청 샘플에서 검출된 비.부르그도르페리의 OspA, OspC 및 OspF 항원에 대한 항체에 대한 단일 및 다중 결과의 비교. 다중 분석 결과는 중앙 형광 강도(MFI)로서 표시된다. 스피어만 순위 상관 관계(r_{sp})는 비교용 각각에 대해 계산되었다.
- 도 8 : 비.부르그도르페리의 OspA, OspC 및 OspF 항원에 대한 항체에 대한 웨스턴 블랏(WB) 및 다중 결과(MFI)는 562개 말의 혈청 샘플에서 비교하였다. MFI 값의 분명한 증가가 p -값 <0.0001 으로 표시된 WB 음성 샘플과 비교한 WB 양성 혈청을 사용함으로써 개선의 비드-기반 분석에 대해 관찰되었다.
- 도 9 : 비.부르그도르페리에 대한 항체의 검출을 위한 다중 분석의 한 구체예의 예시이다. (1) 재조합체 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF의 항원은 형광 비드에 결합된다. (2) 샘플들(예를 들어, CSF 또는 다른 체

액)은 모든 3개의 형광 비드와 동시에 배양된다. (3) 비오틴화된 항-종 특이적 면역글로불린 항체가 분석에 첨가된다. (4) 스트렙타비딘-피코에리트린은 보고자 염료로서 첨가된다. 분석은 그 다음 각 개개 비드 분석을 위한 형광 비드 코드 및 보고자 염료를 검출하는 다중 분석기에서 측정된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명은 포유류에서 라임병 상태의 진단 방법을 제공한다. 일반적으로, 방법은 포유류에서 얻거나 유래된 생물학적 샘플에서 보렐리아 부르그도르페리 (비.부르그도르페리) 외부 표면 단백질(Osp) OspA, OspC 및 OspF의 항체를 결정하는 것을 포함한다. OspA, OspC 및 OspF 항체를 결정하는 것에 기초하여, 포유류가 비.부르그도르페리에 감염되었는지 비감염되었는지를 진단할 수 있다. 다양한 구체예에서, 방법은 비.부르그도르페리에 대하여 백신된 포유류인지 및/또는 초기, 중간 또는 만성 비.부르그도르페리 감염을 가지는 포유류인지를 확인하는 것을 제공한다. 본 발명은 또한 새로운 분리된 비.부르그도르페리 단백질 및 그것의 단편을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0019] 본원에서 사용하는 라임병 "상태"는 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF를 특이적으로 인식하는 항체에 대한 포유류의 항체 프로파일을 말한다. 라임병 상태 결정은 포유류가 다음 목록 중 한가지에 속한다는 결정을 포함할 수 있다: i) 비.부르그도르페리에 대하여 백신되었으나 이것에 의해 감염되지는 않은 것; ii) 초기 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것; iii) 만성 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것; iv) 비.부르그도르페리에 대하여 백신되고 초기 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것; v) 비.부르그도르페리에 대하여 백신되고 만성 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것; vi) 중간 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것; vii) 비.부르그도르페리 감염에 대하여 백신된 적이 있고 중간 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것; viii) 비.부르그도르페리 감염에 대하여 백신된 적이 없고 비.부르그도르페리 감염을 가지지 않는 것. 본원에서 사용하는, "초기" 감염은 2주에서 6주된 감염을 의미한다. "만성" 또는 "후기" 감염은 5개월 이상된 감염을 의미한다. "중간" 감염은 6주에서 5개월된 감염이다.

[0020] 본 발명의 방법은 어떤 포유류에서 라임병 상태를 결정하는데 유용하다. 특정 구체예에서, 포유류는 인간, 말, 개 또는 인간이다. 말은 분류체계 말과(Equidae)의 멤버를 포함한다. 어떤 구체예에서, 본 발명에 따라 진단된 말은 말이다. 개는 분류체계 개과(Canidae)의 멤버를 포함한다. 어떤 구체예에서, 본 발명에 따라 진단된 개는 길들여진 개와 같은 개이다.

[0021] 방법에서 시험된 생물학적 샘플은 항체를 함유할 것으로 예상되는 어떤 생물학적 샘플일 수 있다. 생물학적 샘플은 가급적이면 생물학적 액체이다. 다양한 구체예에서, 생물학적 샘플은 혈액, 혈청, 또는 뇌척수액(CSF)을 포함한다. 생물학적 샘플은 어떤 적합한 기술을 사용하여 포유류에서 얻을 수 있을 것이고, 항체의 존재 또는 부재의 결정에 직접 사용될 수 있을 것이다. 대안으로, 샘플은 그것을 혈액, 혈청, CSF, 또는 어떤 그러한 생물학적 액체의 성분들을 분리하거나 정제하기 위해 수행된 처리 단계와 같은 처리 단계를 받게함으로써 생물학적 샘플로부터 유래될 수 있다.

[0022] 일반적으로, 라임병 상태는 표 1에서 제시된 매트릭스를 사용하여 본 발명에 따라 확인될 수 있고, 여기에서 "+"는 표시된 Osp 항원을 특이적으로 인식하는 항체의 존재를 의미하고 "-"는 그러한 항체의 부재를 의미한다.

표 1

Osp A	Osp C	Osp F	라임병 상태
+	-	-	백신됨
-	+	-	감염-초기(2-3주)
-	-	+	감염-만성
+	+	-	감염-초기 및 백신됨
+	-	+	감염-만성 및 백신됨
-	+	+	감염-중간
+	+	+	감염-중간및 백신됨
-	-	-	감염-비감염 및 백신되지 않음

[0023]

[0024] 표 1에서 제시된 매트릭스는 말과 개의 무리에서 얻어진 수많은 생물학적 샘플을 시험하고 유효화하는 것으로부

터 생성되었고 아래의 설명 및 실시예로부터 더욱 충분히 인식될 것이다.

- [0025] 표 1은 본 발명의 몇가지 비제한의 유용한 양태를 강조한 데이터의 요약을 예시한다. 예를 들어, OspA, OspC 및 OspF 각각에 대한 항체의 존재와 부재는 라임병 상태의 결정적인 평가를 제공하기 위하여 중요하다. 표 1에서 명확하다. OspA에 대한 항체 단독으로 결정하는 것은 비.부르그도르페리 감염에 대한 거짓 양성을 제공할 수 있고, 또한 초기 및 만성 감염에 대한 거짓 음성 결과를 제공할 수 있다는 것은 더욱 명확하다. 마찬가지로, OspA에 대한 항체의 부재 및 OspC에 대한 항체의 부재만으로 결정하는 것은 만성 감염에 대한 거짓 음성 결과만을 산출할 수 있다. 또한, 어떤 다른 항체나 비.부르그도르페리 감염의 표시자를 결정할 필요 없이, OspA, OspC 및 OspF 각각에 대한 항체의 부재를 결정함으로써 감염된 적이 없고 백신된 적이 없다는 결정적인 진단이 만들어질 수 있다. 따라서, OspA, OspC 및 OspF 항원 세개 모두에 대한 항체의 상태를 결정하는 것은 본 발명의 중요한 특징이고, 이전에 이용 가능한 시험보다 예상외의 이점을 제공한다는 것이 인정된다. 이것과 관련하여, 단지 OspA, OspC 및 OspF에 대한 항체를 결정하고, 그러므로 어떤 다른 비.부르그도르페리 항원에 대한 항체는 결정하지 않음으로써 본 발명은 실시될 수 있다. 본 발명의 한 구체예에서, BBK32 단백질에 대한 항체는 결정되지 않는다. BBK32 단백질은 미국 특허 공개 제20060034862호에서 설명되는데, 이로부터 BBK32 단백질의 설명 및 그러한 단백질에 대한 항체의 설명은 본원에서 참고자료로 포함된다.
- [0026] 한 구체예에서, 방법은 OspA, OspC 및 OspF에 특이적인 항체의 존재 또는 부재를 결정함으로써 포유류에서 라임병 상태의 진단을 제공하며, i) OspA에 대한 항체의 존재와 OspC 또는 OspF에 대한 항체의 부재를 결정하는 것에 기초하여 비.부르그도르페리에 대하여 백신되었으나 이것에 의해 감염되지는 않은 것으로서 포유류를 확인하는 것; ii) OspC에 대한 항체의 존재와 OspA와 OspF에 대한 항체의 부재를 결정하는 것에 기초하여 초기 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것으로서 포유류를 확인하는 것; iii) OspF에 대한 항체의 존재와 OspA와 OspC에 대한 항체의 부재를 결정하는 것에 기초하여 만성 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것으로서 포유류를 확인하는 것; iv) OspA와 OspC에 대한 항체의 존재와 OspF에 대한 항체의 부재를 결정하는 것에 기초하여 비.부르그도르페리에 대하여 백신되고 초기 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것으로서 포유류를 확인하는 것; v) OspA와 OspF에 대한 항체의 존재와 OspC에 대한 항체의 부재를 결정하는 것에 기초하여 비.부르그도르페리에 대하여 백신되고 만성 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것으로서 포유류를 확인하는 것; vi) OspC와 OspF에 대한 항체의 존재와 OspA에 대한 항체의 부재를 결정하는 것에 기초하여 중간 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것으로서 포유류를 확인하는 것; vii) OspC, OspF 및 OspA에 대한 항체의 존재를 결정하는 것에 기초하여 비.부르그도르페리 감염에 대하여 백신된 적이 있고 중간 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것으로서 포유류를 확인하는 것; 또는 viii) OspC, OspF 및 OspA에 대한 항체의 부재에 기초하여 비.부르그도르페리에 대하여 백신된 적이 없고 비.부르그도르페리 감염을 가지지 않는 것으로서 포유류를 확인하는 것을 포함한다.
- [0027] 본 발명의 다양한 양태에서, OspA, OspC 및 OspF 항체는 시험 항체로 생각될 수 있다. 라임병 상태를 결정하기 위하여, 포유류에서 얻거나 유래된 생물학적 샘플에서 결정된 시험 항체의 수준은 기준과 비교될 수 있다.
- [0028] 한 구체예에서, 본 발명은 포유류에서 얻거나 유래된 생물학적 샘플에서, 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF에 대한 항체의 시험 수준을 결정하고, OspA, OspC 및 OspF 항체의 시험 수준을 기준과의 비교에 기초하여 비.부르그도르페리에 대하여 백신된 것으로서 및/또는 초기, 중간 또는 만성 비.부르그도르페리 감염을 가지는 것으로서 포유류를 확인하는 것을 포함하는 포유류에서 라임병 상태의 진단 방법을 제공한다.
- [0029] 한 구체예에서, 기준은 시험 샘플에서 항체의 존재 또는 부재를 결정하는데 사용된다. 기준은 시험 항체의 수준의 추정치를 얻는데 또한 사용될 수 있다. 기준은 시험 샘플과 병행해서 설정될 수 있고, 사전-설정될 수 있고 또는 후에 설정될 수 있다.
- [0030] 일반적으로, 기준값은 많은 관심있는 변이체(즉, 경우에 따라 항체 및/또는 항원)의 다르지만 기지의 양을 사용하여 얻어지고 및 당업자에게 알려진 방법에 의해 얻을 수 있다. 기준은 단일값 또는 값들의 범위이다. 예를 들어, 기준은 표준화 곡선 또는 그래프 상의 면적일 수 있다. 특정 구체예에서, 기준은 샘플중의 항체가인식하는 것으로 예상되는 알려진 항원을 사용하여 얻을 수 있다. 항원은 바람직하게는 시험 샘플에서 항체를 결정하는데 사용될 항원이다. 항원의 하나 이상 수준을 샘플에 있을 것으로 예상되는 항체의 하나 이상 수준에 노출시킴으로써, 기준 단일값, 값들의 범위, 그래프 등등이 설정될 수 있다.
- [0031] 한 구체예에서, 기준은 양성 대조군을 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 양성 대조군은 시험 샘플에 대해 사용된 것과 같은 플랫폼에 또는 그 위에 위치된다. 예를 들어, 양성 대조군은 명확한 위치 및/또는 수준에서의 하나 이상의 결정적인 항원이 또한 놓이는 측면 유동 장치 위에 존재할 수 있다. 이 구조는 분석되는 샘플에서 시험 항체가 존재하거나 부재하는 것에 상관없이 시험 조건하에서 대조군 기준으로부터 신호를 제공하고 시험이 적절

히 작용하고 있다는 확인을 제공한다. 예를 들어, 양성 대조군은 인간 또는 기계에 의해 인지할 수 있는 신호를 생성할 수 있다.

[0032] 본 발명의 다양한 양태에서, 시험 항체는 비.부르그도르페리 항원에 대한 시험 항체의 수준의 정성 또는 정량 결정을 제공하기 위해서 기준과 비교될 수 있다. 어느 경우든, 기준과의 비교에 의해서, 시험 항체의 수준은 본 발명의 방법에서 분석되는 샘플에서 존재한 것으로 또는 부재한 것으로서 특징지어질 수 있다.

[0033] 기준은 또한 신호를 생성하지 않게 되도록 하거나 또는 그것으로부터 발생된 어떤 신호도 바탕 신호로 간주되도록 구성될 수 있다. 일반적으로, 이것을 음성 대조군이라고 하며, 시험 항체가 결합할 것으로 예상되는 특정 항원은 제외하고 모든 반응 성분들을 함유한다. 대안으로, 음성 대조군은 또한 소 혈청 알부민 등과 같은 비-특이적 단백질 또는 항원을 또한 함유할 수 있다.

[0034] 어떤 구체예에서, 시험 항원의 수준을 값들의 하나 이상의 범위를 포함하는 기준에 비교한다. 어떤 비제한의 구체예에서, 처음 기준값에 속하는 시험 항체의 수준은 포유류의 라임병 상태에 관한 정보를 주는 시험 항체의 높은 수준을 의미한다. 두번째 기준값 범위에 속하는 시험 항체의 수준은 또한 포유류의 라임병 상태에 관한 정보를 주는 시험 항체의 낮은 수준(이것은 검출할 수 없는 수준 또는 완전한 부재를 포함할 수 있다.)을 의미한다. 세번째 기준값 범위에 속하는 시험 항체의 수준은 수행할 추가적인 시험에 대한 필요를 의미할 수 있다.

[0035] 값의 범위를 포함하는 기준은, 예를 들어, 초기, 만성 또는 중간 비.부르그도르페리 감염으로 확인되거나 또는 비.부르그도르페리 감염을 가지지 않는 것으로 확인되고, 및/또는 비.부르그도르페리 감염에 대하여 백신된 적이 없는 것으로 확인되는 포유류의 그룹으로부터 항체의 평균 수준을 결정하는 것에 의해 생성될 수 있다.

[0036] 어떤 적합한 기술, 장치, 시스템, 및/또는 시약도 OspA, OspC 및 OspF 비.부르그도르페리 항체 및/또는 그것의 조합을 검출하는데 사용될 수 있다. 일반적으로, 항체를 검출하는 방법은 고체 매트릭스와 물리적으로 회합하여 OspA, OspC 및 OspF 단백질 또는 그것의 단편을 사용하는 것을 포함한다. 단백질의 단편들은 비.부르그도르페리에 대하여 백신되거나 또는 비.부르그도르페리에 감염된 포유류에서 생성된 항체에 의해 인식될 것으로 예상되는 것들이다. 그러한 단편들의 아미노산 조성은 본분야의 통상의 기술을 사용하여 확인될 수 있다. 단백질 및/또는 단편들을 비.부르그도르페리에서 얻거나, 분리되거나 또는 유래될 수 있고, 또는 그것들은 크게 다양한 종래 방법들 중 어떤 것을 사용하여 재조합하여 생성될 수 있다. OspA, OspC 및 OspF 비.부르그도르페리 단백질 또는 그것의 단편이 물리적으로 회합된 고체 매트릭스는 어떤 적합한 고체 매트릭스도 될 수 있다. 고체 매트릭스는 멀티-웰 분석 플레이트, 비드, 예를 들면, 형광 표지된 비드, 마이크로스피어, 필터 재료, 측면 유동 장치 또는 스트립에 및/또는 그것의 일부분에 존재할 수 있고, 또는 단백질을 제 위치에 유지하여 이로써 포유류로부터 얻어진 생물학적 샘플에 존재하거나 또는 그로부터 달리 유도된 항체가 포획될 수 있고 검출될 수 있기에 적합한 어떤 다른 형태 또는 포맷으로 존재할 수 있다. 단백질은 고체 매트릭스와 공유 또는 비-공유 회합될 수 있다.

[0037] 한 구체예에서, OspA 단백질은 SEQ ID NO:1:

[0038] MKKYLLGIGLILALIAACKQNVSSLDEKNSVSVLDLPGEMKVLVSKEKNKDGKYDLIATVDKLELKGTSKNNNGSGVLEGVKADKSKVKLTISDDLQQTLEVF
KEDGKTLVSKKVTSDKKSSTEEKFNEKGEVSEKIIITRAGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKGYVLEGLTAEKTTLVVKEGTVTLKSNISKSGEVLVELNDT
DSSAATKKTAAWNSGTSTLTIITVNSKKTKDLVFTKENTITVQYQDSNGTKLEGSAVEITKLDEIKNALK의 서열, 또는 그것의 단편을 포함한다.

[0039] 한 구체예에서, OspC 단백질은 SEQ ID NO:2:

[0040] MKKNTLSAILMTLFLFI SCNNSGKDGNTSANSADSVKGNLTIISKKITDSNAVLLAVKEVEALLSSIDELAKAIGKKIKNDGSLDNEANRNESLLAGAYT
ISTLITQKLSKLNSEGLKEKIAAAKKCEEFSTKLKDNHAQLGIQGVTDENAKKAILKANAAGKDKGVVE
LEKLSGSLESLSKAAKEMLANSVKELTSPVVAESPKKP의 서열, 또는 그것의 단편을 포함한다.

[0041] 한 구체예에서, OspF 단백질은 SEQ ID NO:3:

[0042] MNKKMFIICAVFALII SCKNYATSKDLEGAVQDLESSEQNVKKTEQEIKKQVEGFLEILETKDLNKLDTKEIEKRIQELKEKIEKLDSKKTISIETYSEYEK
LKQIKEKLKGGADLEKLGLEDLSKKKKEERKKALEDKAKKFEFGQVGSATGVTTGHRANQGSIGAQAQQCANSLGLGVSYSSSTGTDSNELANKVID
DSIKKIDEELKNTIENNGEVKKE의 서열, 또는 그것의 단편을 포함한다.

[0043] 본원에서 제공된 실시예에서 설명한 분석에서 사용된 Osp 단백질의 아미노산 서열은 새롭다. 특히, 표 2a는 이전에 공개된 비.부르그도르페리 Genbank 서열과 차이를 제시한다.

[0044] 표 2a 이전에 존재하는 비.부르그도르페리 Genbank 서열의 사전 존재와 상동성의 정도

	OspA	OspC	OspF
플라스미드 전체 서열	OspA/pRSET-1	OspC/pCR4-2	OspF/pCR4-5
크기(bp/aa)	822bp/273aa	636bp/211aa	684bp/227aa
Genbank 기탁 번호	HM756743	HM756744	HM756745
이전에 이용 가능한 B31의 기탁 번호	NC_001857	NC_001903	L13925
B31 유전자 크기(bp/aa)	identical	633bp/210aa	693bp/231aa
뉴클레오타이드 상동(%)	99.8%	85.8%	91.6%
아미노산 상동(%)	99.3%	79.8%	85.3%

[0045]

[0046] bp = 염기 쌍; aa 아미노산

[0047] 표 2b. 발현에 사용된 서열 및 다중 분석에 사용된 rOspA, rOspC 및 rOspF

	OspA	OspC	OspF
발현에 사용된 염기 전체 유전자 서열에 기초	1-666 of SEQ ID NO:14	52-636 of SEQ ID NO:16	178-684 of SEQ ID NO:18
정방향 프라이머	OspAFBam	OspCF-Bam2	OspF-178-B
역방향 프라이머	OspARKpn	OspCR-Kpn	OspF-684-K
크기(bp/aa)	666bp/222aa	585bp/194aa	507bp/168aa
발현에 사용된 플라스미드	OspA(1A)/pQE30-2	OspC2(B/K)/pQE30-2	OspF(3A)/pQE30-1

[0048]

[0049] 표 2c : 발현 클로닝에 대한 프라이머

	정방향	역방향
OspA (1-666)	Cgcggtatccatgaaaaatatttattggg (SEQ ID NO:4)	Gcggtacacctcaagtgagtgctgaattcc (SEQ ID NO:5)
OspC (52-636)	Cgcggtacacctgtgaataattcagggaag (SEQ ID NO:6)	Gcggtacacctcaaggttttttgactttctgc (SEQ ID NO:7)
OspF (178-684)	Cgcggtatccgagacgaaagattgaataa (SEQ ID NO:8)	Gcggtacacctattcttttttgacttctcc (SEQ ID NO:9)

[0050]

[0051] 제한 부위는 밑줄을 그었다; 정지 코돈은 굵게 표시된다.

[0052] Genbank 기탁 번호 HM756743, HM756744 및 HM756745와 관련된 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 본 발명의 수행에서 결정되었고, 빨라도 2011년 1월 1일까지는 처음에는 공식적으로 접근 가능하지 않았다. 따라서, 다양한 구체예에서 표 2b에 제시된 바와 같이, Osp 항원에 관한 항체를 포획하기 위한 본 발명의 방법에서 사용되는 Osp 항원은; 여기에서 기술된 OspA 뉴클레오타이드 서열의 뉴클레오타이드 1-666에 의해 코딩된 아미노산 서열(SEQ ID NO:15), 및/또는 OspC 뉴클레오타이드 서열의 뉴클레오타이드 52-636에 의해 코딩된 아미노산 서열(SEQ ID NO:17), 및/또는 여기에서 기술된 OspF 뉴클레오타이드 서열의 뉴클레오타이드 178-684에 의해 코딩된 아미노산 서열(SEQ ID:19)을 포함한다.

[0053] 다양한 구체예에서, 본 발명은 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 또는 SEQ ID NO:3의 서열을 포함하거나 또는 그로 구성되는 분리된 또는 제조합체 단백질을 포함하는 조성물을 제공한다. 이러한 단백질 단편이 또한 제공되고 포함하거나 구성되는 단편을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 단백질 또는 그것의 단편은 여기에서 더 기술된 조성물 및/또는 키트의 구성 요소로서 제공될 수 있다. 예를 들어, 그것들은 그것들을 특이적으로 인식할 수 있는 비.부르그도르페리 항체의 존재 또는 부재를 결정하기 위해 사용될 수 있는 어떤 시스템의 부분, 장치, 또는 조성물로서 제공될 수 있다. 한 구체예에서, 단백질은 고체 매트릭스와 물리적으로 회합하여 제공될 수 있다. 한 구체예에서, 고체 매트릭스는 비드(마이크로스피어)이다.

[0054] 비제한 실시예에서, 비.부르그도르페리의 항체는 웨스턴 블랏, 효소-연결된 면역흡착제 분석(ELISA), 스냅

시험, 다양한 종류의 다중 항체 검출 기술, 또는 관심 있는 항체를 검출하기에 적합한 이러한 분석의 어떤 변형을 포함하지만 반드시 이것으로 제한되지는 않는 어떤 면역검출 기술을 사용하여 검출될 수 있고 서로 식별될 수 있다.

[0055] 한 구체예에서, OspA, OspC 및 OspF 항원은 측면 유동 스트립상에 또는 측면 유동 스트립으로서 구성된 고체 매트릭스와 물리적으로 회합하여 분리된 장소에 제공된다. 포유류에서 얻거나 또는 그로부터 유도된 생물학적 샘플은 OspA, OspC 및 OspF 항원을 특이적으로 인식하는 개별 항체들의 존재가 각 항원에 대한 항체의 존재 또는 부재를 가리키는 분리된 신호를 생성하도록 스트립을 사용하여 분석될 수 있다. 모든 항원에 대한 항체의 부재는 포유류가 비.부르그도르페리가 대해서 백신된 적이 없고 비.부르그도르페리에 감염된 적이 없다는 것을 나타낸다. 항체의 존재나 부재는 일반적으로 표 1에 제시된 매트릭스와 관련하여 해석될 수 있다.

[0056] 한 구체예에서, OspA, OspC 및 OspF에 대한 항체 또는 그것들의 조합은 형광 비드에 결합한 OspA, OspC 및 OspF 항원을 사용하여 검출된다. 형광 비드는 어떤 적합한 형광 비드도 될 수 있고, 그 예는, 예를 들어, Luminex Corporation으로부터 상업적으로 이용 가능하다. 비드는 다르거나 같은 형광에 의해 검출 가능한 부분으로 표지될 수 있다. 비드는 각 개별 항원에 결합된 비드는 서로 식별될 수 있도록 코딩될 수 있다. 포유류에서 얻거나 유도된 생물학적 샘플에 존재하는 항체는 각 비드 타입이 결합되는 항원에 따라 항체-결합된 형광 비드에 결합할 것이다. 검출 가능한 표지에 콘주게이트된 항-종 특이적 항체는 OspA, OspC 및 OspF 또는 그것들의 조합에 대한 항체의 존재 또는 부재를 검출에 사용될 수 있고, 그런 다음 이것은 예를 들어, 표 1에 제시된 매트릭스에 따라 라임병 상태를 진단하기 위해 사용될 수 있다.

[0057] 본 발명에 따른 항체를 결정하기 위한 다중 형광 비드-기반 분석의 한 가지 예시된 실시예를 도9에 설명한다. 도 9로부터 알 수 있는 바와 같이: (1) 재조합체 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF 항원을 형광 비드에 결합하고; (2) 샘플들(예를 들어, 혈청, CSF, 또는 다른 체액)을 동시에 모든 3개의 형광 비드와 배양하고; (3) 비오틴화된 항-종 특이적 면역글로불린 항체는 분석에 첨가하고; (4) 스트렙타아비딘-피코에리트린을 보고자 염료로서 첨가한다. 분석은 그런 다음 각 개개의 비드 분석을 위해 형광 비드 코드 및 보고자 염료를 검출하는 다중 분석기에서 측정한다. 스트렙타아비딘 및 비오틴과 같은 부분 및 그들의 유도체 및 다른 보고자 염료는 다중 분석에서 같거나 비슷한 기능을 수행할 수 있는 다양한 상업적으로 이용가능한 대체제로 대체될 수 있다.

[0058] 형광-기반 항체 검출 방법으로부터 나온 산출 데이터는 당업자들에게 잘 알려진 다양한 방법으로 표시될 수 있다. 한 구체예에서, 형광-기반 항체 검출은 중앙 형광 강도(MFI)로서 제공될 수 있다. 본 발명에서, 본 발명자들은 일정한 MFI 값 범위들이 특히 말 및 개에서 라임병 상태를 결정하기 위해 사용될 수 있다는 것을 결정하였다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 MFI 값은 표 3에 제시된 것들을 포함한다.

[0059] 표 3 : 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF에 대한 항체에 대한 형광 비드-기반 다중 분석을 사용하는 개 또는 말의 샘플에 대한 음성, 불분명 및 양성 해석 범위.

비.부르그도르페리 항원	해석	다중 분석 범위(MFI)	
		개	말
OspA	음성	<500	<1000
	불분명	≥500 <1,500	≥1000-2000
	양성	≥1,500	>2000
OspC	음성	<250	<500
	불분명	≥250 <1,000	≥500-1000
	양성	≥1,000	>1000
OspF	음성	<750	<750
	불분명	≥750 <1,500	≥750-1250
	양성	≥1,500	>1250

[0060]

[0061] 샘플을 음성 또는 양성으로 분류하기 위해 표 3의 불분명 결과 세트는 추가적인 시험이 수행되어야 한다는 것을 나타낸다.

[0062] 한 구체예에서, 방법은 말의 라임병 상태를 결정하기 위해 수행된다. 이 구체예는 말에서 얻거나 유래된 생물학적 샘플에서 OspA, OspC 및 OspF 항체의 존재나 부재를 결정하는 것을 포함한다. 항체의 존재나 부재는 어떤 적합한 기술을 사용하여 결정되고, 한 구체예에서 이것은 형광 비드와 물리적으로 결합되어 제공된 OspA, OspC 및

OspF 항원을 포함하는 다중 분석이다. OspA, OspC 및 OspF 항원은 말에서 얻거나 유래된 생물학적 샘플과 접촉한다. 만약 항원에 대한 항체가 존재한다면, 항체는 항원에 결합할 것이고 그것 때문에 항원/형광 비드 복합체에 고정될 것이다. 검출이 가능하도록 라벨된 항-개 특이적 항체를 첨가하고 다중 분석기를 사용하여 항-개 특이적 항체로부터 형광 비드와 검출 가능 라벨을 검출하여 각 OspA, OspC 및 OspF 항체에 대한 MFI 값을 발생시킨다. 항체의 존재나 부재는 표 3의 말 값 세트에 따라 결정되고, 라임병 상태의 결정은 표 1의 매트릭스 세트에 따라 만들어진다. 같은 논거가 개에서 얻거나 유래된 생물학적 샘플 분석에 적용되고, 이것에 의해 개의 샘플에 대한 표 3의 MFI 값 세트는 항체의 존재나 부재를 결정하는데 사용되며, 항-개 특이적 항체는 항-말 특이적 항체 대신 사용된다. 따라서, OspA, OspC 및 OspF 항체에 대한 MFI 값을 결정하는 것에 기초하여, 말 또는 개가 비.부르그도르페리에 감염되었는지 또는 비감염되었는지 진단할 수 있고, 및 더욱이 비.부르그도르페리에 대하여 백신된 적이 있는지 및/또는 초기, 중간 또는 만성 비.부르그도르페리 감염을 가지는지 확인할 수 있다.

[0063] 다양한 구체예에서, 본 발명은 유형 매체에서 항체의 결정을 고정하는 것을 추가로 포함한다. 유형 매체는 DVD, CD-ROM, 휴대 가능한 플래시 메모리 장치 등을 포함하지만 이것으로 제한하지는 않는 디지털 매체의 어떤 종류와 같은 유형 매체의 어떤 종류도 될 수 있다. 라임병 감염을 가졌던 것으로 결정된 포유류의 치료에 대한 권고를 개발하기 위해 본 발명은 유형 매체를 동물 소유자, 사육자, 및/또는 동물 건강 관리 제공자에게 제공하는 것을 포함한다.

[0064] 또한 본 발명에서 제공된 것은 항체를 결정하기 위한 장치이다. 한 구체예에서, 장치는 고체 매트릭스와 물리적으로 결합한 OspA, OspC 및 OspF 항원을 포함하는 측면 유동 장치이다. 한 구체예에서, OspA, OspC 및 OspF는 단지 고체 매트릭스와 결합하여 제공된 비.부르그도르페리 항원이다. 한 구체예에서, 장치와 함께 제공되는 OspA, OspC 및 OspF 항원은 본원에서 기술된 아미노산 서열을 포함하거나 그것으로 구성된다.

[0065] 또한 본 발명에서 제공하는 것은 항체의 존재나 부재를 결정하기 위한 키트이다. 한 구체예에서, 키트는 고체 매트릭스와 물리적으로 결합한 OspA, OspC 및 OspF 항원을 포함한다. 한 구체예에서, OspA, OspC 및 OspF는 단지 키트와 함께 제공된 비.부르그도르페리 항원이다. 키트는 고체 매트릭스로서 형광 비드를 포함할 수 있다. 키트는 하나 이상의 분리된 바이알에서 항원 및 또는 비드를 추가로 포함 할 수 있다. 키트는 키트의 사용을 위한 설명서를 선택적으로 포함한다.

[0066] 다음 실시예는 예시를 의도하고 본 발명을 제한하지 않는다.

실시예 1

[0067] 본 실시예는 본 방법의 한 구체예의 설명을 제공하여 개에서 라임병 상태를 결정하기 위한 본 방법의 향상된 이용성을 증명한다. 특히, 본 실시예에서, 본 발명자들은 개의 혈청에서 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF 항원에 특이적인 항체의 즉각적인 검출을 위한 형광 비드-기반 다중 분석의 개발 및 유효화를 설명한다. 유효화는 다중 분석 결과를 웨스턴 블라팅(WB)인 라임병 진단을 위한 권장된 확진 시험과의 비교에 의해 수행되었다(예를 들어, www.cdc.gov/ncidod/dvbid/lyme/ld_humandisease_diagnosis.htm 참조). 본 발명의 이점들 중에서도 특히, OspC는 적합 진단 마커가 아니라는 개에 관한 과거 연구와는 반대로, 본 발명은 명확하게 다르게 보여준다. 특히, 본 실시예에 나타난 시험 결과는 어떤 현재 이용 가능한 라임병 시험 방법에 비교하여 개에서 라임병 상태의 향상된 결정을 제공하고, OspA, OspC 및 OspF에 대한 항체 결정에 의해 개의 최근 백신 및 감염의 보다 나은 정의를 제공한다.

[0068] 다음 재료 및 방법은 본 실시예에서 나타난 결과를 얻기 위해 사용되었다.

[0069] 보렐리아 부르그도르페리 유전자의 클로닝

[0070] 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF 단백질은 이.콜라이(*E.coli*)에서 발현되었고 다중 분석에서 항원으로 사용되었다. DNA는 Westchester County, New York 숲 지역에서 수집된 감염된 익소테스 다미니(*Ixodes dammini*) 진드기로부터 유래된 비.부르그도르페리에서 분리되었다(Appel et al. 1993). 완전 OspC 및 OspF 유전자는 *Pfu* DNA 폴리머라제를 사용한 PCR로 증폭되었다(Stratagene, La Jolla, CA, USA). OspC 및 OspF 프라이머는 각각 Genbank 기탁 번호 NC_001903 및 L13925에 따라서 디자인되었다. 증폭에 사용된 프라이머의 위치는 괄호에 주어졌다: OspC forward (1-23) 5' atgaaaaagaatacatattaagtgc 3' SEQ ID NO: 10; OspC reverse (633-607) 5' ttaaggttttttggactttctgccac 3' SEQ ID NO: 11; OspF forward (16-44) 5' atgaataaaaaaatgtttattattttgtgc 3' SEQ ID NO: 12; and OspF reverse (708-688) 5' ttattcttttttgacttctcc 3' SEQ ID NO: 13. PCR은 이전에 설명한 것처럼 수행되었다(Wagner et al., 2001). PCR 생성물은 pCR4 TopoBlunt 벡터로 클로닝되었고(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 및 BioResource Center, 코넬 대학에서 ABI 아로마틱 서열 결정기를 사용하여 서열 결정

되었다. OspA 유전자는 플라스미드 OspA/pRSET에서 증폭되었다. 클론된 유전자의 완전 코딩 영역의 뉴클레오티드 서열은 Genbank에 제출되었고 기탁 번호 HM756743(OspA), HM756744(OspC) 및 HM756745(OspF)를 받았다.

비.부르그도르페리 유전자의 발현 및 정제

클로닝 발현은 표 2에서 또한 언급되어 있는 다음 DNA 서열에 기초하여 수행되었다.

OspA (822bp), Genbank 기탁 HM756743

atgaaaaaatatttatttgggaataggtctaataatagccttaataagcatgttagcaaaatgttagcagccttgacgagaaaaacagcgcttcagtagatttg
cctggtagaatgaaagtctttagtaagcaaaagaaaaacaaagacggcaagtagcatctaattgcaacagtagacaagcttgagcttaaggaacttctgat
aaaaacaatggatctggagtagttagaaggcgtaaaagctgacaaaagttaagtaaaatatacaatttctgacgatctaggtaaacacacacttgaagtttc
aaagaagatggcaaacacttagtatcaaaaaagtaacttccaaagacaagtcataacagaagaaaaatcaatgaaaaaggtagaatctgaaaaaata
ataacaagagcagacggaaccagacttgaatacacaggaattaaaagcgatggatctggaaaagctaaagaggttttaaaaggctatgttctgaaggaact
ctaactgctgaaaaacaacattggtaggttaagaaggaactgttactttaagcaaaaatatttcaaaatctggggaaggttttagttgaacttaatagacact
gacagtagtgctgctactaaaaaactgcagcttggaaatcgggcacttcaactttaacaattactgttaacagtaaaaaaactaaagaccttgtgtttaca
aaagaaaacacaattacagtaacaatacagactcaaatggcaccaaattagaggggtcagcagttgaaattacaaaacttgatgaaattaaaaacgcttta
aaataa SEQ ID NO: 14

MKKYLLGIGLILALIAACKQNVSSLDEKNSVSVLDLPGEMKVLVSKEKNKGKDYDLIATVDKLELKGTSKNNNGSGVLEGVKADKSKVKLTI SDDLQQTLEVF
KEDGKTLVSKKVTSKDKSSTEEKFNKGEVSEKIIITRADGTRLEYTGKSDGSGKAKEVLKGYVLEGLTAEKTTLVVKEGTVTL SKNISKSGEVLVELNDT
DSSAATKKTAWNSTST SEQ ID NO: 15

OspC (636bp), Genbank 기탁 HM756744

atgaaaaagaatacattaagtgaatattaatgactttattttattttatatcttgaataattcagggaaagatgggaatacatctgcaaatctgctgat
gagctgtttaagggcctaatacttacagaaataagtaaaaaat tacggattctaatacgcggttttacttgctgtgaaagaggttgaagcgttgctgtcatct
atagatgagcttgctaaagctatttggtaaaaaaataaaaaacgatgtagtttagataatgaagcaaatcgcaacgagtcattgttagcaggagcttataca
atatcaaccttaataacacaaaaat taagtaaat taacggatcagaaggtttaagggaaagatgcccgcagctaagaaatgctctgaagagtttagtact
aaactaaaagataatcatgcacagcttggtatacagggcggttactgatgaaaatgcaaaaaaagctattttaaaagcaaatgcagcgggttaagataagggc
gttgaagaacttgaaaagtgtccggatcat tagaaagcttatcaaaagcagctaagagatgcttgctaatcagttaaagagcttacaagccctgttgtg
gcagaaagtccaaaaaaccttaa SEQ ID NO: 16

SCNNSGKDGNTSANSADSVKGNLITEISKKITDSNAVLLAVKEVEALLSSIDELAKAIGKKIKNDGSLDNEANRNESLLAGAYTISTLITQKLSKLNSE
LKEKIAAAKKCSEEFSTKLKDNHAQLGIQGVTDENAKKAILKANAAGKDKGVEELEKLSGSLESLSKAAKEMLANSVKELTSPVVAESP KKP SEQ ID
NO: 17

OspF (684bp), Genbank 기탁 HM756745

atgaataaaaaaatgtttattatttgtgctgtttttgcgttgataatttcttgcaagaattatgcaactagttaagatttagaaggggcagtgcaagattta
gaaagttcagaacaaaatgtaaaaaaacagaacaagagataaaaaacaagttgaaggtatttagaaattctagagacgaaagatttgaataaattggat
acaaaagagattgaaaaacgaattcaagaattaaaggaaaaaatagaaaaattagattctaaaaaacttctattgaacatatctgagtagaagaaaaa
ctaaaacaataaaagaaaaattgaaggaagagcgatcttgaagataaattaaagggacttgaagatagcttaaaaaagaaaaagaggaaagaaaaaa
gcttttagaagatgctaagaagaaatttgaagagtttaaggacaagttggatccgcgactggagtaactaccgggcataagagctggaaatcaaggttagtatt
ggggcacaaagcttggcagtgctaatagtttgggggtgggtgttaagttattctagtagtactggtagtagcaatgaattggcaaacaaagttatagat
gattcaattaaaaagatttagaagagcttaaaaaatactatagaaaaataatggagaagtaaaaaagaataa SEQ ID NO: 18

ETKDLNKLDTKEIEKRIQELKEKIEKLDSSKTSIETYSEYEEKLKQIKEKLGKADLEDKLKGLEDKSLKKKKEERKKALEDAKKKFEEFKGQVGSATGVTG
HRAGNQSGSIGAQWQCANSLGLGVSYSSSTGTDSNELANKVIDDSIKKIDEELKN TIENNGEVKKE SEQ ID NO: 19

발현 클로닝을 위해 OspA(염기 1-666), OspC(염기 52-636) 및 OspF(위에서 기술된 DNA 서열의 염기 178-684)을
먼저 *Bam*HI(5') 및 *Kpn*1(3') 제한 자리와 프라이머를 사용한 PCR에 의해 증폭시켰다. 유전자는 pQE-30 Xa 발현
벡터로 클론되었고(Qiagen Inc., Valencia, CA) ImM IPTG와 유도 후에 이.콜라이 SG13009 세포에서 His-태그된
단백질로 발현되었다(Qiagen Inc., Valencia, CA). 박테리아를 100mM 인산 나트륨, 10mM 트리스 및 8M 우레아,
pH8.0을 함유한 완충제에서 용해시켰다. 용해물은 40mM 이미다졸 완충제에서 1:5로 희석되었고 His-태그된 단백
질을 AKTA-FPLC 기기를 사용하여 HisTrapFF 컬럼에서 정제하였다(둘 다 GE Healthcare, Piscataway, NJ 제품).
단백질 농도는 BCA 분석에 의해 결정되었다(Pierce, Rockford, IL).

[0083] SDS-PAGE 및 웨스턴 블라팅

[0084] SDS-PAGE, 웨스턴 블라팅 및 면역블라팅(후자의 두 가지는 여기서 WB로 말한다.)은 기술된 대로 수행되었다(Wagner et al., 2005). 간략히, 재조합체 비.부르그도르페리 단백질의 2-4 μ g/레인 은 환원 조건 하에 15% 미니-겔에서 분리되었다(BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). 겔은 면역블라팅을 위해 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색하거나 또는 단백질을 멤브레인(PVDF, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA)에 옮겼다. 옮긴 후에, 차단 단계를 트리스 완충제(0.1M 트리스, pH7.6 0.05% (v/v) Tween20을 함유하는 것)에서 5%(w/v) 비-지방 분유를 사용하여 수행하였다. 그런 다음, 멤브레인은 5% 비-지방 분유를 갖는 트리스 완충제에서 1:10로 희석된 개의 혈청과 함께 배양하였다. 2차 퍼옥시다제가 콘주게이트된 토끼 항-개 IgG(H+L) 항체를 검출을 위해 사용하였다(Jackson ImmunoResearch Lab., West Grove, PA). 각 항체의 배양 후에, 멤브레인을 트리스 완충제로 세 번 씻었고, 항체 결합은 ECL 화학발광 방법에 의해 가시화되었다(Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA). 추가로, 다중 분석의 유효화를 위해 사용된 모든 혈청을 이전에 설명한 바와 같은 전체 박테리아 용해물을 사용한 종래 비.부르그도르페리 WB(Appel et al. 1993)에 의해 시험하였다.

[0085] 재조합체 비.부르그도르페리 항원을 형광 비드에 결합

[0086] 각 정제된 재조합체 비.부르그도르페리 단백질 총 100 μ g을 형광 비드에 결합시켰다(Luminex Corp.). OspA는 비드33에 결합되었고, OspC는 비드34에 결합되었고, 및 OspF는 비드37에 결합되었다. 결합은 비드 공급자 Luminex Corporation에서 말한 프로토콜에 따라 수행되었다(참조, www.luminexcorp.com/uploads/data/Protein%20Protocols%20FAQs/Protein%20Coupling%20Protocol%200407%2010207.pdf). 간략히, 전체 공정은 상온에서 수행되었다. 총 원심 분리 단계는 4분 동안 14,000xg에서 수행되었다. 그 후에, 비드는 20초 동안 볼텍싱 및 초음파에 의해 재현탁되었다. 활성을 위해, 5x10⁶ 비드는 H₂O에서 한차례 씻었다. 비드는 100mM 인산 나트륨 완충제, pH6.2의 80 μ l에서 재현탁되었다. 그런 다음, 10 μ l 술포-NHS(50mg/ml) 및 10 μ l 1-에틸-3-[3-다이메틸아미노프로필]카보다이아마이드 하이드로클로라이드(EDC, 50mg/ml, 두 개 모두 Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL)는 첨가되었고 20분 동안 배양되었다. 비드는 50mM 2-[N-모르폴리노]에테인술포산, pH 5.0(MES)과 두 차례 씻었고, MES 용액에서 재현탁되었다. 이러한 활성 비드는 재조합체 비.부르그도르페리 항원의 결합에 사용되었다. 결합은 순환에서 세 시간 동안 수행되었다. 결합 후에, 비드는 차단 완충제에서 재현탁되었고(1%(w/v) BSA 및 0.05% (w/v) 아자이드화 나트륨과 PBS) 및 30분 동안 배양되었다. 비드는 0.1%(w/v)인 BSA, 0.02%(v/v)인 Tween20 및 0.05%(w/v)인 아자이드화 나트륨(PBS-T)과 PBS에서 세 차례 씻었고, 계산되고 2-8 $^{\circ}$ C 암소에서 저장되었다.

[0087] 조명 분석

[0088] OspA, OspC 및 OspF와 결합된 비드는 각 1x10⁵ 비드/ml의 최종 농도로 차단 완충제에서 초음파되었고, 혼합되었고, 및 희석되었다. 분석을 위해, 마이크로티터 웰 당 5x10³ 비드/각각이 사용되었다. 모든 개의 혈청 샘플은 차단 완충제에서 1:600으로 희석되었다. 사전에 시험된 음성, 낮은 양성 및 높은 양성 개의 혈청 및 차단 완충제과 홀로 배양된 비드는 각 분석 플레이트에서 양성 및 음성 대조군로서 기능되었다.

[0089] MiUipore Multiscreen HTS 플레이트(MiUipore, Danvers, MA)는 ELx50 플레이트 위셔를 사용한 PBS-T(Biotek Instruments Inc., Winooski, VT)와 2분 동안 담겼다. 용액은 플레이트에서 흡입되었고 각 대조군 혈청의 50 μ l 또는 샘플은 플레이트에 적용되었다. 그런 다음, 비드 용액의 50 μ l는 각 웰에 첨가되었고 상온에서 셰이커에 30분 동안 배양되었다. 플레이트를 PBS-T와 씻었고 차단 완충제에서 1:5000으로 희석된 비오틴화 항-개 IgG(H+L)의 50 μ l(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)는 각 웰에 첨가되었고 위와 같이 30분 동안 배양되었다. 씻기 후에, 차단 완충제에서 1:100으로 희석된 스트렙타아비딘-피코에리트린의 50 μ l(Invitrogen, Carlsbad, CA)는 첨가되었다. 플레이트를 위와 같이 30분 동안 배양하였고 씻었다. 비드는 차단 완충제의 100 μ l에서 재현탁되었고 및 각 플레이트는 비드를 재현탁하기 위해 15분 동안 셰이커에 위치되었다. 분석은 Luminex IS 100 기구에서 분석되었다(Luminex Corp.). 데이터는 중앙 형광 감도(MFI)로 보고되었다.

[0090] 혈청샘플

[0091] 모든 혈청학적 샘플을 비.부르그도르페리에 대한 항체의 혈청학적 시험을 위해 코넬 대학의 동물 건강 진단 센터에 첨부하였고, 비.부르그도르페리에 대한 항체를 검출하기 위해 역학적 ELISA에 이어서 WB로 시험하였다. 두 분석은 비.부르그도르페리의 전체 세포 용해물을 사용하였고 사전에 설명한 것처럼 수행되었다(Appel et al. 1993, Jacobson et al. 1996). 두 개의 개 혈청 샘플 세트는 이 접근을 위해 분석되었다.:

[0092] 첫째, 비.부르그도르페리의 항체에 대한 가능한 ELISA 및 WB 결과와 79개의 혈청 샘플은 각 항원에 대한 비드-기반 분석의 상태를 설정 및 단일 및 다중 분석의 결과 비교에 사용되었다. 이러한 79개의 샘플은 ELISA 및 WB에 의한 음성에서 높은 양성 결과의 범위를 갖는 샘플의 비슷한 수를 제공하기 위해 선택되고, 이에 따르는 결과는 백신되었거나 및/또는 자연적으로 감염된 개로부터 혈청을 포함한다. 둘째, 사전에 시험안된 총 188개의 개 혈청 샘플이 추가 다중 분석 유효화에 사용되었다. 모든 샘플들은 WB에 의해 비.부르그도르페리 항원에 대한 항체와 병행하여 분석되었다. 블랏에서 31kDa(OspA), 22kDa(OspC) 및 29kDa(OspF)에 대한 혈청 항체의 존재나 부재는 다중 분석 결과를 인식하지 못한 관찰자에 의해 보지않고 결정되었다. WB 결과는 각 항원에 대해 '상대적인 황금률'을 제공하였고, 리시버 작동 곡선(ROC) 분석을 위해 사용되었고, 다중 분석에서 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF 항원에 대한 항체의 해석범위를 결정하기 위해 사용되었다.

[0093] 통계 분석

[0094] 단일 및 다중 분석 포맷으로 얻어진 결과의 비교를 위해, 모든 샘플의 대응 MFI 값은 스피어만 순위 상관 관계 값 계산에 의해 각 비.부르그도르페리 항원에 비교되었다. WB에 의해 시험될 때 반응 항원에 대해 음성 또는 양성 중 하나인 샘플에 대한 다중 분석 MFI 값의 차이를 비교하기 위하여 만-휘트니스 시험은 수행되었다. 만-휘트니스 시험은 의미를 위해 95%의 신뢰 간격 및 컷-오프로써 $p < 0.05$ 를 사용하여 가우시안 근사치, 2-사이드와 기능되었다. 다중 분석 포맷에서 각 비드 분석을 위한 감도 및 특이성을 결정하기 위해 각 혈청 샘플의 WB 결과(양성/음성)를 사용하여 ROC 곡선은 생성되었고, MFI 값에 비교하여 '황금률'로써 상응 단백질은 다중 분석을 사용하여 그 샘플 및 재조합체 항원을 얻었다. 가능 비율 분석은 다중 분석에서 해석 범위 및 진단 감도와 특이성을 결정하기 위해 수행되었다. ROC 곡선 및 가능 분석은 각 항원에 대해 분리되어 수행되었다. 스피어만 순위 상관 관계 값 및 만-휘트니스 시험은 GraphPad Prism 프로그램, 버전 5.01.을 사용하여 수행되었다. ROC 곡선은 MedCalc 프로그램, 버전 11.2.0.0; 2010 F. Schoonjans, Mariakerke, 벨기에.을 사용하여 생성되었다. 가능 분석은 Statistix 9.0, 2008, Analytical Software, Tallahassee, FL, 미국.를 사용하여 수행되었다.

[0095] 결과

[0096] 비.부르그도르페리 항원의 발현

[0097] 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF 단백질의 세포 밖의 부분은 이.콜라이에서 발현이 되었고, 각각 333, 194 및 169 아미노산의 크기이다. rOspA 단백질의 결과는 분자량 30 kDa으로 계산되었다. 30 kDa에서 상응하는 두드러진 단백질의 추가는, 22 및 42 kDa의 두 개의 약한 단백질이 rOspA의 친화력 정제 동안 다른 단백질과 작은 오염을 제한한 정제 후에 관찰되었다. 계산된 분자량은 rOspC는 17.5 kDa이고, rOspF는 15.2 kDa이다. SDS-PAGE에 의해 찾은 결과 단백질은 두 단백질의 이합체 반응을 제안하는 rOspC에 대해 29 kDa이고 및 rOspF에 대해 27 kDa이다.

[0098] 형광 비드-기반 분석의 개발

[0099] 재조합체 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF 단백질은 형광 비드와 결합되었다. 비.부르그도르페리의 항체에 대한 알려진 WB 시험 결과와 사전 시험된 개의 혈청 샘플은 각 비드-기반 분석의 상태 설정에 사용되었다. 긍정 및 부정 결과는 각 분석 플레이트에서 확인되었고 포함되었다(표 3). 그런 다음, 총 79개의 혈청은 단일 분석에서는 각 개개의 항원들과 함께 및 다중 분석에서는 개선의 항원들을 즉시 사용하여 측정되었다(도 2). 단일과 다중 사이의 스피어만 순위 상관 관계 값은 0.93(OspA), 0.88(OspC) 및 0.96(OspF)이었다. 멀티플렉스 분석의 평균 바탕값은 혈청 없이 40회의 실행에 의해 결정되었고, OspA 및 OspC 분석에 대해 <10 MFI이고 OspF 분석에 대해 80 MFI이었다.

[0100] 표 4: 20개의 분리된 다중 분석으로 얻어진 OspA, OspC 및 OspF 분석에 대한 MFI값(평균±기준 편차)은 개의 대조군 혈청 샘플(양성, 낮은 양성 및 음성) 및 바탕값(희석 완충제)을 사용하여 실행되었다.

[0101] 표 4.

	OspA	OspC	OspF
양성 혈청	10386 ± 2292	3759 ± 1012	21976 ± 2924
낮은 양성 혈청	965 ± 298	1125 ± 297	5336 ± 1289
음성 혈청	201 ± 72	48 ± 17	244 ± 71
바탕값(완충제)	7 ± 2	4 ± 1	84 ± 4

[0102]

[0103] OspA, OspC 및 OspF에 대한 WB 및 다중 분석 결과의 비교

[0104] 188개 개의 혈청에서 WB 및 다중 분석 결과는 각 단백질과 비교되었다. 도 3은 감염된(레인 2), 백신된(레인 3), 및 비-감염된/비-백신된 개 혈청(레인 4)에서 종래의 WB 결과를 보여준다. OspA 다중 결과는 WB에서 31kDa 단백질의 발생에 비교되었고, OspC는 22kDa 단백질에 비교되었고, OspF는 29kDa 단백질에 비교되었다. WB 결과는 각 세개의 항원에 대해 음성 또는 양성으로 분리되고 그룹되었다(도 4). 188개 혈청에서, WB에 의해 107개는 31kDa OspA 항원으로 검출되고, 39개는 22kDa OspC로 검출되고, 및 82개는 29kDa OspF 단백질로 확인되었다. 명백히 높은 MFI 값($p < 0.0001$)은 음성 WB 결과와 비교된 WB 양성 혈청을 사용하여 모든 세개의 비.부르그도르페리 단백질에 대한 다중 분석에서 얻어졌다. 추가로, 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF 항원에 대한 ROC 곡선은 '상대적인 황금률'로서 188개의 혈청의 WB 결과를 사용하여 생성되었다(도 5). ROC 곡선은 다중 분석 및 OspA, OspC 및 OspF에 대한 WB 결과 사이에서 높은 일치를 보여준다.

[0105] 다중 분석 결과의 해석

[0106] 다중 분석에서 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF 항원에 대한 해석 범위를 결정하기 위해 가능성 분석은 수행되었다. 그 분석은 황금률과 비교할 때 혈청 분석이 대부분 항상 어떤 거짓 양성 및 거짓 음성 결과가 발생하는 것이 고려되었다(Jacobson et al. 1996). 이것은 증가된 비-특이적 결합을 보여주는 어떤 혈청의 성질에 의해, 차선의 황금률에 의해, 또는 비교되었던 분석에서 분석적인 감도의 차이에 의해 야기된다. 따라서, 음성, 불분명, 및 양성 해석 범위는 각 항원에 대해 결정된다. 표 5는 해석 범위, 양성 결과의 가능 비율(LR+) 및 개의 혈청에서 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF 각 항원에 대한 항체의 다중 분석의 진단 감도와 특이성을 보여준다. 다중 포맷에서 OspA, OspC 및 OspF 분석의 진단 특이성은 각 90%, 89% 및 86%이다. 진단 감도는 각 83%(OspA), 62%(OspC) 및 82%(OspF)이다.

[0107] 표 5: 개의 혈청에서 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF에 대한 항체의 형광 비드-기반 다중 분석의 해석 범위.

	다중 분석 (MFI)	참 양성 (WBpos)	거짓 양성 (WBneg)	LR+	감도 (%)	95% CI	특이성 (%)	95% CI
OspA								
음성	<500	3/107	41/81	0.055				
불분명	≥500 <1,500	15/107	32/81	0.35				
양성	≥1,500	89/107	8/81	8.40	83	75-90	90	82-96
OspC								
음성	<250	3/39	65/149	0.18				
불분명	≥250 <1,000	12/39	67/149	0.68				
양성	≥1,000	24/39	17/149	5.40	62	45-77	89	82-93
OspF								
음성	<750	3/82	37/106	0.11				
불분명	≥750 <1,500	12/82	56/106	0.28				
양성	≥1,500	67/82	15/106	5.75	82	72-89	86	78-92

[0108]

[0109] 앞서 말한 바에서 분명할 것은, 본 실시예에서, 우리는 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF 항원에 대한 혈청 항체를 즉각 검출하기 위해 다중 분석의 개선 및 유효화를 증명한다. 다중 분석은 한 테스트에서 ELISA 및 WB의 최근 시험 과정을 결합하고, 백신이나 감염의 마커로서 각 비.부르그도르페리 항원 사이를 또한 구별한다. ELISA에 이어서 WB는 비.부르그도르페리에 대한 항체의 검출을 위한 황금률로 여전히 고려된다. 비.부르그도르페리의 전체 세포 용해물에서 수행되는 ELISA는 높은 진단 감도를 가지고 있으나 상대적으로 낮은 진단 특이성을 가진다(Jacobson et al. 1996). 전체 세포 용해물을 사용하는 거짓 양성 ELISA 결과는 스피로헤타 단백질과 함께 혈청 항체의 반응에 의해 야기되었고, 그것은 다른 박테리아, 예를 들어, 비.부르그도르페리의 편모 단백질의 상응 단백질과 높은 상동성을 공유한다(Lindenmayer et al. 1990, Shin et al. 1993). 다중 분석은 개선되었고, 여기서는 비.부르그도르페리의 새로운 재조합체 단백질을 사용하였고, 새로운 분석에서 교차-반응에 대한 가능성을 감소시켰다.

- [0110] 본원에서, 우리는 특이한 비.부르그도르페리 항원에 대한 WB결과를 상응하는 OspA, OspC 및 OspF 항원에 대한 다중 결과에 비교하였다. ROC 곡선 분석은 두 시험 사이에서 좋거나 매우 좋은 연계를 나타낸다. 그러나, WB 및 다중 분석 사이에서 차이는 관찰되었다. 차이에 대한 한가지 가능한 설명은 WB는 일반적으로 특이한 밴드가 존재하는지 아닌지 관찰자의 주관적인 해석에 의존한다는 것이었다. WB의 해석은 또한 블랏 개선에서 날짜-에서-날짜 다양성에 영향을 받는다. WB의 분석 감도(low $\mu\text{g/ml}$ range)는 ELISA(low ng/ml range)보다 낮았고, 다중 분석의 분석적 감도(low pg/ml range)보다 훨씬 낮았다. 따라서, 비.부르그도르페리에 대한 항체의 더 낮은 농도와 다양한 혈청은 WB에 의해 검출되지 않았고 다중 분석에 의해 확인되었다.
- [0111] 반면에, 블랏에서 WB의 어떤 밴드에 비교한 다중 분석의 분석 감도 증가는 또한 잘못 해석될 수 있다. 예를 들어, 비.부르그도르페리는 WB에서 22kDa 근처에 나타나는 두 개의 단백질, OspC 및 22kDa의 추가적인 단백질을 표현한다(Magnarelli et al. 2001). 그 이유는 비.부르그도르페리의 원액 준비는 일반적으로 WB에 사용되고, OspC의 항체 분석은 샘플에서 22kDa의 항체의 존재에 의해 복잡해지기 때문이다. 결론적으로, 22kDa 밴드는 WB에 의해 확인되고, OspC의 항체에 언제나 일치하지는 않는다. 이것은 우리가 비드-기반 OspC 분석 및 WB 결과 사이에서 관찰했던 낮은 일치율을 설명한다. 따라서, OspC 다중 분석에 대한 참 진단 특이성과 감도는 WB에 의해 검출된 22kDa 단백질에 비교하여 계산된 것보다 높을 것이다. 종합적으로, 우리는 WB가 오직 비.부르그도르페리의 항체를 검출하는 다른 분석의 유효화에 대한 '황금률'이라는 결론을 내렸다.
- [0112] 188개의 개의 혈청을 사용하여, 우리는 OspC(n=39) 및 OspF(n=82)에 대한 WB 양성 샘플의 총 수에서 높은 차이를 관찰하였다. 이것은 비.부르그도르페리 항원의 다른 표현 및 위에서 토의된 결과 숙주 항체 반응의 일치이다. 진단 영역에서 유래된 샘플들을 제출하였고, 및, 따라서, 이러한 개의 감염 및/또는 백신의 시간은 알려지지 않았다. 우리는 혈청 샘플에 의존하여 OspC이나 OspF 중 하나 또는 둘 모두에 대한 항체는 다중 분석에 의해 검출될 수 있다는 것과 외부 표면 단백질 검출 패턴은 비.부르그도르페리에 감염된 다른 단계를 나타내는 것을 관찰하였다. 따라서, OspA, OspC 및 OspF 항원에 대한 다른 항체 패턴은 개에서 비.부르그도르페리에 대한 노출이 발생할 때 나타난다. 감염 단계에서 그러한 향상된 결정은 치료 결정에 유용하고 치료 성공을 예상한다.
- [0113] 따라서, 비.부르그도르페리 감염의 지표인 및/또는 백신에서 발생한 항체인 개의 혈청에서 항원을 결정하기 위해 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF 항원의 항체 검출을 위한 본 실시예에서 설명한 다중 분석은 정량적, 경제적 및 중요한 대안을 제공한다.

실시예 2

- [0114] 본 실시예는 개에서 라임병 상태를 결정하기 위한 방법의 향상된 유틸리티를 실례를 들어가며 보이며 방법의 한 구체예의 설명을 제공한다. 말에 대한 다중 분석은 실시예 1에서 개의 라임 분석에 대한 사전 설명으로서 백신 및/또는 초기 또는 만성 감염에 대한 마커로서 OspA, OspC 및 OspF를 사용한다. 일반적으로, 다중 분석은 생물학적 샘플에서 해결가능한 분석의 즉각적인 검출의 원칙을 사용한다 (Morgan et al. 2004, Prabhakar et al. 2005). 그것은 분석의 매트릭스를 제공하는 각 항원과 결합된 형광 비드에 기초한다. 다중 분석은 일반적으로 pg/ml 범위로 항체를 검출하고, 반면에 ELISA는 ng/ml 범위로 및 WB는 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 검출한다(Kellar and Douglas 2003, Morgan et al. 2004, Wagner and Freer 2009). 따라서, 말에 대한 새로운 라임 다중 분석은 비.부르그도르페리 감염 또는 비.부르그페리의 백신에 대한 특이적 마커 단백질에 기초하고, 또한 감염된 직후 만큼 항체의 농도가 낮은 상황에서 또는 신경학적 징후를 나타내는 말의 샘플에서 이점이 있다.
- [0115] 다음 재료 및 방법은 본 실시예에서 나타내는 결과를 얻는데 사용되었다.
- [0116] **제조합체 비.부르그도르페리 단백질 및 형광 비드에 결합**
- [0117] 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF 항원은 이.콜라이에서 발현되었고, 실시예 1에서 설명한 것처럼 형광 비드에 결합하였다. OspA는 비드 33에, OspC는 비드 34에, OspF는 비드 37에 결합하였다. 결합은 비드 공급기에서 말한 프로토콜에 따라서 수행되었다.
- [0118] **다중 분석**
- [0119] 다중 분석은 다음 변화와 함께 실시예 1에서 개의 혈청 샘플에 대하여 사전에 설명한 것처럼 수행되었다: 말 혈청은 1:400으로 희석되었다. 혈청 항체의 검출을 위해 비오틴화된 염소 항-말 IgH(H+L) 항체(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)는 1:3000의 희석에 사용되었다. 모든 다른 리간드, 완충제, 배양 단계는 사전에 기술된 과정과 같았다. 분석은 Luminex IS 100 기구로 분석되었다(Luminex Corp.). 데이터는

중앙 형광 감도로서 보고되었다(MFI).

[0120] 말 혈청

[0121] 혈청학적 라임 시험을 위해 모든 말의 혈청 샘플을 코넬 대학의 동물 건강 진단 센터에 첨부하였고, 비.부르그도르페리에 대한 항체의 검출을 위해 역학적 ELISA에 이어서 WB로 시험하였다. 모든 두개의 분석은 비.부르그도르페리의 전체 세포 용해물을 사용하였고 사전 설명한 것처럼 수행되었다(Chang et al. 2000a). 두 개의 말 혈청 샘플은 이 접근을 위해 분석되었다;

[0122] 첫째, 가능한 ELISA 및 WB 결과와 81개의 말 혈청 샘플은 각 항원에 대한 비드-기반 분석의 상태 설정에 사용되었고 단일 및 다중 분석의 비교에 사용되었다. 81개의 샘플은 ELISA 및 WB에 의해 확인된 음성에서 높은-양성까지의 해석 범위를 가지는 샘플의 비슷한 수를 제공하기 위하여 선택되었고, 백신 및/또는 자연적으로 감염된 말의 혈청을 포함한다. 둘째, 사전에 시험되지 않은 총 562개의 말 혈청 샘플은 추가 다중 분석 유효화를 위해 측정되었다. 이 샘플들을 2008년 7월에서 2009년 6월 사이에 코넬 대학의 동물 건강 진단 센터에 첨부하였다. 또한 모든 샘플을 WB에 의해 비.부르그도르페리 항원에 대한 항체 분석에 사용되었다. 다중 분석 결과를 인식하지 못한 관찰자가 블랏에서 31kDa(OspA), 22kDa(OspC) 및 29kDa(OspF)에 대한 혈청 항체의 존재(양성) 또는 부재(음성)를 보지 않고 결정하였다(도 6).

[0123] 통계 분석

[0124] 첫째 혈청 샘플 세트(n=81)에서 얻은 MFI 값을 단일 분석 및 다중 분석 포맷으로 분석되었고, 스피어만 순위 상관 관계 값의 계산으로 각 비.부르그도르페리 항원과 비교하였다. 샘플에 대한 다중 분석 MFI 값의 차이를 비교하기 위해 만-휘트니스 시험을 수행하였고, 그것은 WB으로 시험할 때 각 항원에 대한 음성 또는 양성 이었다. 만-휘트니스 시험은 95%의 신뢰 구간 및 의미를 위한 컷-오프로서 0.05 미만의 p상태에서, 가우시안 근사치, 2-사이드로 실행되었다. 스피어만 순위 상관 관계 값 및 만-휘트니스 시험은 GraphPad Prism 프로그램, 버전 5.01.을 사용하여 수행되었다.

[0125] 둘째 혈청 샘플 세트(n=562)에서, WB 결과를 리시버 작동 특징(ROC) 곡선 분석에서 '상대적인 황금률'(양성/음성)로 사용되었고, 다중 MFI 값과 비교하였다. 이 분석에서 WB를 참 황금률로 추정했다(즉, 100% 진단 감도 및 특이성). 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF 항원에 대한 항체 해석의 범위 및 다중 분석의 진단 감도와 특이성 범위를 결정하기 위하여 가능 비율 분석을 수행하였다. ROC 곡선 및 가능 분석을 각 항원에 대해 분리하여 수행하였다. ROC 곡선을 MedCalc program, 버전 11.2.0.0 2010, MedCalc Software, Broekstraat 52, 9030 Mariakerke를 사용하여 생성하였다. 가능 분석은 Statistix 9.0, 2008, 분석 소프트웨어, Tallahassee, FL, 미국을 사용하여 수행되었다.

[0126] 둘째 혈청 샘플 세트를 Bayesian 통계 접근에 또한 사용하였는데, 이것은 만약 참 황금률이 존재하지 않는다면 분석 실행의 연구에 위해 사용될 수 있다(Wang et al. 2007). 라임 항체 시험에 대한 WB는 단지 '상대적인 황금률'로 고려될 수 있는데, 이것은 WB의 나쁜 통계 감도와 특이적 밴드가 존재하는지 판단하는 분석에서 WB의 주관적인 성분 때문이다(Wagner et al. 2011). 데이터는 진단 특이성, 감도 및 두 시험에 대한 양성 컷-오프 값을 확인하기 위해 Bayesian, 새로운 라임 다중 분석 및 WB를 사용하여 분석된다.

[0127] Bayesian 접근은 질병 표시의 다른 발병을 가진 두 그룹을 요구하는데, 그렇지 않으면 파라미터 측정에 사용되는 Bayesian 모델은 비-동일하게 된다(Wang et al. 2006, Wang et al. 2007). 따라서, 혈청 샘플을 인위적으로 두개의 그룹으로 나누었다. 2008년 7월에서 12월 사이에 수집한 모든 샘플(n=408)을 그룹 1로 분류하였고, 2009년 1월에서 7월 사이에 수집한 모든 샘플(n=156)을 그룹 2로 분류하였다. 이 분류는 라임병의 지표로 비.부르그도르페리에 대한 항체의 발병률은 1년중 처음 6개월보다 7월에서 12월까지가 더 높다는 가정에 기초한다. 이 연구는 OspC 및 OspF의 항체에 대해 가정이 참이라는 것을 보였고 및 연구는 수행되었다. OspA에 대해, 두 그룹 사이의 발병은 유사하게 낮고, Bayesian 접근은 OspA 분석에 사용되지 않을 수 있다.

[0128] 결과

[0129] 비.부르그도르페리의 항체 검출을 위한 말의 다중 분석의 개선

[0130] 비.부르그도르페리의 항체와 함께 또는 이것 없이 총 81개의 사전 시험된 말의 혈청이 형광 비드-기반 분석의 상태를 설정에 사용되었다. 비드는 비.부르그도르페리의 제조합체 OspA, OspC 또는 OspF 항원과 결합하였다. 이 항원에 대한 혈청 항체의 측정은 각 비드에서 분석(단일)의 실행에 의해 및 또한 다중 분석에 의해 비교되었다(도 7). 비.부르그도르페리의 항체에 대한 다중 및 단일 분석결과는 매우 연관성이 있다. 각 항원에 대한 스피

어만 순위 상관 관계 값은 OspA, OspC 및 OspF는 0.77, 0.83, 및 0.96이었다. 다중 분석에 대한 바탕값은 OspA 및 OspC는 10 MFI 미만 값 및 OspF는 100 MFI 미만 값이었다(표 6). 81개의 혈청 샘플에서 OspA는 347에서 21650까지, OspC는 75에서 3842까지, OspF는 192에서 23209까지 사이의 MFI 값을 발생시켰다.

[0131] 표 6: 말의 혈청에서 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF 항원에 대한 항체의 형광 비드-기반 다중 분석의 중앙 형광 감도 (MFI) 값(중앙, 범위) 및 바탕값 (n=562).

	^a 배경값	WB 음성	WB 양성
OspA	3.5 (2.5 - 8.0)	866 (160-20,451)	2317 (206-27,471)
OspC	4.7 (3.0 - 8.0)	439 (59-4702)	1106 (128-9261)
OspF	85.0 (62.5-96.5)	848 (209-14,550)	2560 (217-25,961)

[0132] ^a바탕값은 혈청 없이 다중 분석 실행으로 분리된 18개에서 얻었다.

[0134] WB =웨스턴 블랏

[0135] 말의 라임 다중 분석의 유효화

[0136] OspA, OspC 및 OspF의 항체에 대한 다중 분석의 유효화는 총 562개의 말 혈청에서 WB로 얻어진 결과에 상응하는 다중 결과를 비교하여 수행되었다. WB에 의해, OspC 및 OspF에 대한 항체는 진드기에 물린 후 비.부르그도르페리에 감염된 말에서 검출될 수 있다. OspA에 대한 항체는 라임병에 대한 백신 후에 생성될 것으로 고려된다(도 6). 다중 분석에서 얻어진 MFI 값은 WB 음성 및 양성 혈청 샘플에 비교되었다. 이것은 개개 항원에 대하여 WB 음성 샘플과 비교된 WB 양성 샘플에서 MFI 값의 결정적인 증가를 보여주었다(도 8). 총 MFI 값에서 이러한 결정적인 차이에도 불구하고, 분석은 WB 음성 및 양성 샘플의 MFI 값 사이에 겹침을 또한 보여주었고(표 6) 이것은 다양한 통계 접근으로 다중 분석 컷-오프 값의 추가 측정을 요구했다.

[0137] '상대적인 황금률'로서 WB를 사용한 분석

[0138] WB의 상대적으로 나쁜 분석 감도 및 WB 측정에 포함된 주관적 성분 때문에 WB는 단지 '상대적인 황금률'로서 고려될 수 있다. 그럼에도 불구하고, WB에서 각 OspA, OspC 또는 OspF 분석에 대한 다중 분석 결과에 상응하는 밴드가 존재하는지 에 대한 비교로 ROC 곡선은 생성되었다. ROC 곡선의 아래 면적은 OspA는 0.765이고, OspC는 0.773이고, OspF는 0.738이었다. WB 음성 및 WB 양성 샘플에서 MFI 값의 겹침 때문에(도 8), 우리는 각 비드-기반 분석에서 음성, 불분명, 및 긍정 세 개의 해석 범위를 설정하기 위하여 가능-비율 분석을 또한 수행하였다. 진단 감도 및 특이성 값은 가능 분석의 양성 컷-오프 값에 기초하여 계산되었다(표 7).

[0139] 표 7: 말의 혈청에서 비.부르그도르페리 OspA, OspC 및 OspF에 대한 항체의 형광 비드-기반 다중 분석의 해석 범위.

	다중 분석 (MFI)	참양성 % (WBpos)	거짓양성 % (WBneg)	LR+	감도 (%)	특이성 (%)
OspA						
음성	<1000	18.6	57.6	0.323		
불분명	≥1000-2000	32.6	27.4	1.19		
양성	>2000	48.8	15.0	3.25	49	85
OspC						
음성	<500	19.1	59.2	0.323		
불분명	≥500-1000	25.0	26.5	0.943		
양성	>1000	55.9	14.3	3.91	56	86
OspF						
음성	<750	15.4	42.4	0.363		
불분명	≥750-1250	12.5	24.4	0.512		
양성	>1250	72.0	33.2	2.17	72	67

[0140]

[0141] LR = 가능 비율

[0142] Bayesian 모델을 사용한 참 황금률의 부재에서 분석 유효화

[0143] WB는 또한 몇가지 잘못된 해석을 발생하려는 경향을 고려하여, 우리는 비교된 두 시험을 위한 진단 감도 및 특이성을 측정하는 Bayesian 접근을 사용하여 다른 분석을 수행하였다. 그 분석은 다른 발병률을 가지는 두 개의 실험 그룹을 요구했다. 데이터를 1년 이내에 제출된 샘플에서 얻었고, 그들은 인위적으로 7월에서 12월 사이에 제출된 혈청(그룹 1) 및 1월에서 6월 사이에 제출된 샘플(그룹 2)로 나뉘어졌고, 그룹 1의 라임병 발병률이 높을 것으로 추정하였다. 분석은 비.부르그도르페리에 대한 항체의 발병률이 두 개 감염 마커 OspC 및 OspF에 대해서는 그룹 1에서 더 높았고, 백신 마커 OspA에 대해서는 아니라는 것을 확인하였다. 따라서 그 모델은 단지 OspC 및 OspF에 대한 항체의 결과에서 실행될 수 있고, 독립된 두 개의 시험으로써 비드-기반 분석 및 WB를 비교하였고, 그것 중 어떤 것도 황금률이 아니다(표 8). OspC에 대한 항체에서, 비드-기반 분석에서 진단 감도는 80%이었고 진단 특이성은 79%이었다. OspC WB에서는 단지 감도는 72%이었고 특이성은 92%이었다. OspF에 대한 항체에서, 비드-기반 분석에 대해 감도는 86%이었고 특이성은 69%이었다. OspF WB에서는 감도는 80%이었고 특이성은 77%이었다. Bayesian 분석에서는 다중 분석보다 WB에 의해서 더 많은 거짓 음성이 얻어졌다는 것을 제시한다. WB에서 더 높은 특이성 값은 이 시험에 의해 검출된 낮은 수의 거짓 양성의 표시이었다. OspC 및 OspF 비드-기반 분석에 대한 컷-오프 값은 각각 813 MFI 및 1270 MFI 이었고, 이것은 가능 분석에 의해 정의된 것으로서 불분명(OspC) 또는 매우 낮은 양성(OspF) 해석 범위에 속한다(표 7 및 8).

[0144] 표 8: 비.부르그도르페리의 OspC 또는 OspF의 항체에 대한 새로운 다중 분석 과 웨스턴 블라팅을 비교한 Bayesian 통계 분석.

비.부르그도르페리 외부 표면 단백질	시험	감도(%)	특이성(%)	최적 컷-오프 값(다중)
OspC	다중	80 (68-90)	79 (73-85)	813
	WB	72 (55-89)	92 (88-96)	NA
OspF	다중	86 (77-93)	69 (60-79)	1270
	WB	80 (70-89)	77 (69, 88)	NA

[0145]

- [0146] 진단 분석 감도 및 특이성은 95% 신뢰 간격 수준과 최적 값의 조건에서 표현되었다.
- [0147] NA = WB는 정성 시험이기 때문에 적용할 수 없고 따라서 컷-오프 값이 없다.
- [0148] 앞서 말한바와 같이 본 실시예에서 라임병에 대한 항체 표시의 검출을 위한 새로운 다중 분석을 개선하기 위해 비.부르그도르페리의 OspA, OspC 및 OspF 항원이 발현된 이.콜라이를 사용하였다. 새로운 다중 분석의 유효화에서 주요 도전은 컷-오프 값, 해석 범위, 및 진단 감도와 특이성 값을 설정하기 위한 참 황금률의 부재이다. 비.부르그도르페리에 대한 항체의 검출에 대한 WB는 확인 시험 및 혈청학적 라임 진단을 위한 최고 가능한 표준으로 고려된다. 유효화 시험에 대한 황금률로서 WB를 사용하는 경우에는 이 방법에서 100% 진단 감도 및 특이성을 가진 것으로 추정한다. 이 사실에 기초하면 새로운 시험은 종래의 황금률 방법의 사용에 의한 시험보다 결코 더 좋을 수 없다. 그런데, WB는 정성 시험이고 이것의 분석 감도에 한계가 있으며, 일상적으로 변화하는 블랏 개선 및 경험 있는 평가자에 의해 잘못된 밴드 해석을 일으킬 수 있는 주관적인 측정이다(실시예 1). WB 결과 해석은 매우 높은 항체 역가를 가진 샘플 또는 격리된 실험적으로 감염된 말을 향하고 있지만, 감염력이 알려지지 않았을 때 및/또는 혈청이 비.부르그도르페리의 낮은 항체 수준을 함유하고 있을 때 임상 상태가 더 어려울 수 있다. WB 측정에서 이러한 특징은, WB와 다중 기술 사이에서 통계 감도 차이가 예상되게 하였고, 우리에게 새로운 라임 다중 분석 유효화를 위한 다른 통계 접근 탐색을 야기하였다. 종래 ROC-곡선 및 가능-비율 분석은 WB가 참 황금률이라는, 즉, 100% 정확도라는 가정에서 수행되었다. Bayesian 모델 접근으로 황금률의 부재 상태에서 진단 분석을 분석할 수 있고(Wang et al. 2006, Wang et al. 2007) WB와 동일 시험으로서 다중 분석을 비교하였다. 그러므로, 이 분석은 두 분석에서 진단 감도 및 특이성 데이터를 발생시켰다. 비록 모든 이러한 가정이 전적으로 참이 아니더라도 그들의 통계 감도가 명확하게 매우 다른 두 시험 때문에, Bayesian 분석은 WB가 참 황금률이 아니라는, 즉, 100% 정확도가 아니라는 고려에 의해 새로운 다중 분석의 진단 감도 및 특이성을 더 정확하게 측정할 수 있도록 허용한다. 결론적으로, 라임 다중 분석에 대한 진단 감도 및 특이성 값은 '상대적인 황금률' 접근보다 Bayesian 방법에서 더 높았다. 종래의 황금률 분석은 각각 OspC 및 OspF 비드-기반 분석에서 감도는 56% 값 및 72% 값을, 및 특이성은 86% 값 및 67% 값을 제시하였다. 상기 WB에 대한 토의에 기초하여, 이 값은 다중 분석의 참 특이성 및 감도도 추정되었다. Bayesian 모델은 WB에서 후자 서술을 확인하였고, OspC 및 OspF 비드-기반 분석에 비교한 WB에 대해서 낮은 진단 감도이지만 높은 진단 특이성을 계산하였다. Bayesian 분석에서 OspC는 80%의 진단 감도 및 OspF는 86%인 진단 감도를 발생시켰고, 이와 비교된 WB에서는 각각 72% 및 80%이었다. 다중 분석에서 진단 감도 값은 종래 황금률 접근에 비교면 명확히 향상되었고 실질적인 감도 값을 잘 반영하는데, WB($\mu\text{g/ml}$)에 비교하면 다중 분석(pg/ml)에 의한 항체 검출의 향상된 진단 감도 때문이다. Bayesian 분석을 사용하는 다중 분석의 진단 감도는 OspC는 79%(WB 92%) 및 OspF는 69%(WB 77%)이었고, 이것은 또한 황금률 계산과 비교하여 OsF는 향상되었고 OspC 약간 낮았다. OspC 분석에 대한 특이성 값에 대한 차이의 한 이유는 황금률 분석보다 Bayesian 접근 계산에서 OspC에 대한 낮은 컷-오프 값을 적용하여 두 통계 분석에서 OspC에 대한 컷-오프 값에서의 큰 차이가 나기 때문이다.
- [0149] 황금률 및 바이에시안 분석은 또한 OspC 및 OspF에 대한 항체의 컷-오프 값 설정에 사용되었다. OspC에 대해, 가능-비율 분석에서는 양성 컷-오프 값이 1000MFI를 초과한다는 것이 제시되었고 Bayesian 접근에서는 813MFI보다 훨씬 낮은 컷-오프 값을 확인하였다. OspF에 대해, 가능 분석에서는 최적 양성 컷-오프로서 1250MFI를 초과한다는 것을 확인하였고, 이것은 Bayesian 접근에서 1270MFI 컷-오프인 것과 거의 일치하였다.
- [0150] OspC에 대해 거의 10.000MFI 값이고, OspF에 대해 25.000MFI가 초과된 우리의 샘플에 대해 다중 분석의 넓은 역학적 범위를 고려하면, 제안된 컷-오프 값은 이 시험의 넓은 역학적 범위를 확인하고, 이것은 말의 혈청에서 비.부르그도르페리에 대한 항체의 세밀한 정량 분석을 허용한다. 넓은 역학적 정량 범위는 더욱 좁은 라인 정량 범위를 가지는 ELISA와 같은 최근 정량 시험과 비교면 다중 접근에서 상당한 장점이다(Wagner and Freer 2009). 우리의 경험에서, 증가된 라이너 역학 범위의 가장 큰 장점은 혈청은 다중 분석에서 단일 희석으로 사용될 수 있다는 것이고, 결과는 거의 항상 분석의 라이너 정량 범위 결과에 대한 매우 적은 예외와 맞고, 그것은 분석의 상단 평탄역에 속하며, 즉, 이 혈청은 각 비.부르그도르페리 Osp 항원에 대한 매우 높은 농도의 항체를 함유한다는 점이다.
- [0151] 현재 기존의 라임 ELISA는 전체 비.부르그도르페리 용해물에 종종 기초하고 감염 및 백신을 구별하지 않는다. 이 분석은 용해 혼합물에서 보통 박테리아 성분에 비-특이적 교차-반응의 위험을 드러낸다(Lindenmayer et al. 1990, Shin et al. 1993, Jacobson et al. 1996). 따라서, 만약 양성이라면 이 분석은 정성 WB와 같은 제2의 확인 시험이 필요하다. 항체의 정량이 요구되는 상황에서, 예를 들어, 라임병에 걸린 말에서 성공적인 항생제 치료를 결정하기 위해, 시험은 항상 두 시험을 요구한다: 첫째, 항체 감소를 확인하기 위한 정량 ELISA 및 라임 병을 나타내는 항체에 특이한 감소를 확인하는 제2의 WB. 다른 온-사이드(스틱-기반 시험) 또는 C6에 대한 항체

의 결정과 같은 시험에 기초한 ELISA는 라임 병원체가 있는 말의 감염과 관련된 웰에서 발견되었다(Johnson et al. 2008, Hansen et al. 2010, Maurizi et al. 2010). 그런데, C6에 대한 항체는 종래의 비.부르그도르페리 ELISA에 의해 검출된 항체보다 더 일찍 검출되었거나 더 빨리 감소되지 않았다(Johnson et al. 2008).

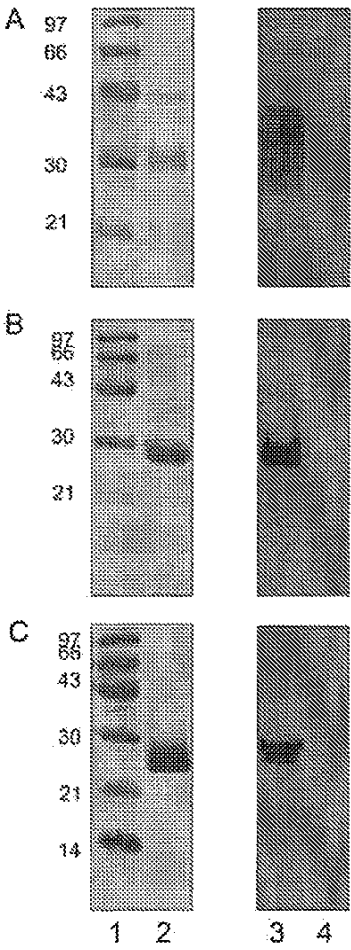
[0152] WB 및 새로운 다중 라임 분석 두 개 모두는 자연적인 비.부르그도르페리 감염으로 발생한 항체 또는 백신 후 생성된 항체 사이를 구별할 수 있다. 후자 반응은 사람, 실험 설치류, 개(Fikrig et al. 1990, Schaible et al. 1990, Jacobson et al. 1996, Wittenbrink et al. 1996, Wieneke et al. 2000, Topfer and Straubinger 2007) 및 말(Chang et al. 2000b)에서 설명한바로서 비.부르그도르페리의 OspA 항원에 대한 높은 항체 값으로 특징지어진다. 말에서 사용되는 승인된 백신은 현재 존재하지 않는다. 따라서, 개에 대한 백신은 라임 병이 풍토성인 곳에서 기르는 말에 사용된다(Divers 2009). 승인된 백신의 부재는 우리의 샘플 세트에서 OspA 양성 말 혈청의 낮은 총 수를 설명한다(562 중에서 43). Bayesian 모델은 OspA의 항체에 대한 이 데이터 세트에서 수행될 수 없는데, 그 이유는 비슷한 두 그룹 사이에서 OspA에 대한 항체의 발병 때문이다. 백신을 언제든지 접종할 수 있고, 환경에서 감염된 진드기의 발생에 의존하는 비.부르그도르페리 감염은 계절의 영향을 반드시 따르지 않기 때문에 이것은 놀랍지 않다. 풍토성인 곳에서 기르는 백신된 말에 대해서, 백신 역가의 정량 측정은 유용한 정보인데 그것은 이런 말에서 라임병을 예방하기 위한 재-백신하거나 하지않는다는 결정을 보낼 수 있다. 새로운 다중 분석은 제1의 가능한 시험인데 그 시험은 정량 항체가 백신 마커 OspA에 반응하고 감염된 것으로부터 백신에 반응하는 숙주를 구별할 수 있다. 백신 반응은 단지 OspA에 대한 항체에 의해 또는 사용된 백신에 의존한 OspA 및 OspC에 대한 항체에 의해 특징지어질 수 있다.

[0153] 간략히, 말에 대한 새로운 라임 다중 분석 유효화를 위한 두 통계 접근의 사용은 감염 마커 OspC와 OspF에 대한 비슷한 컷-오프 값 및 진단 감도와 특이성을 발생시킨다. 분석은 또한 WB의 제1의 진단 감도와 특이성 측정, 비.부르그도르페리의 항체 분석에 대한 종래 황금률을 발생시킨다. 다중 분석의 총 수행은 WB와 비교하여 향상된 통계 및 진단 감도를 보인 가능한 시험을 보여준다. 말에 대한 새로운 라임 다중 분석은 말에서 라임병에 감염 및/또는 백신을 나타내는 항체 검출에 대해 유용하고, 빠르고, 감도 있고 및 정량 기구를 제공한다.

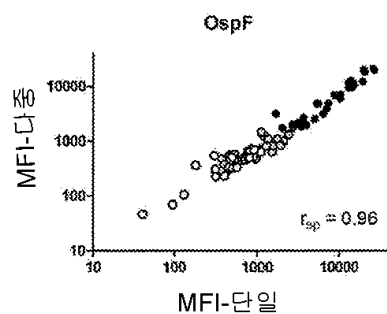
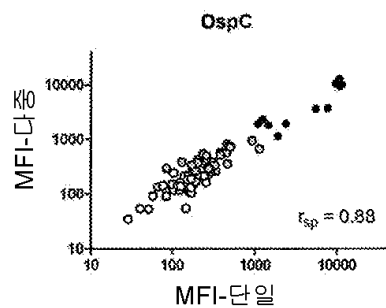
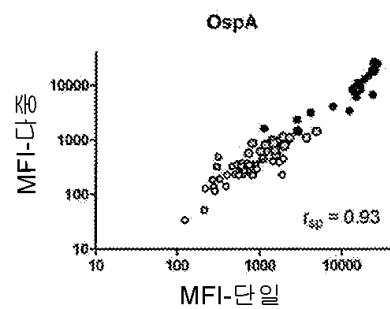
[0154] 반면에 본 발명은 실시예에서 예시를 통해 설명되었고, 일반적인 수정은 당업계에서 숙련을 통해 나타낼 것이고, 이 수정은 발명의 범위를 의도하지 않는다.

도면

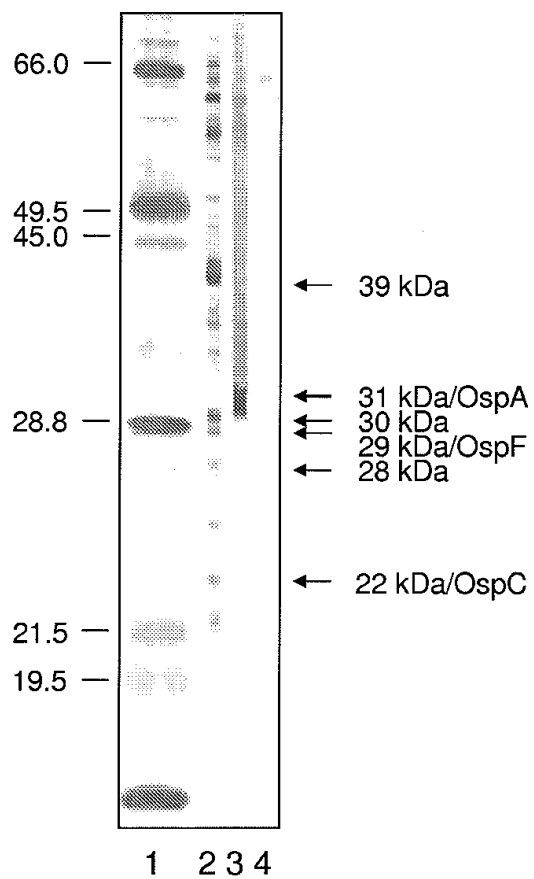
도면1



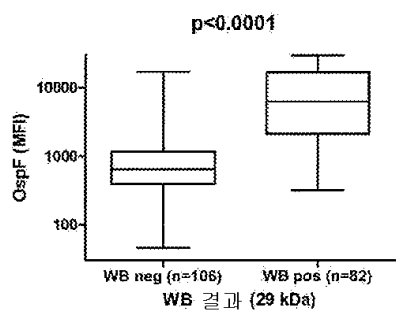
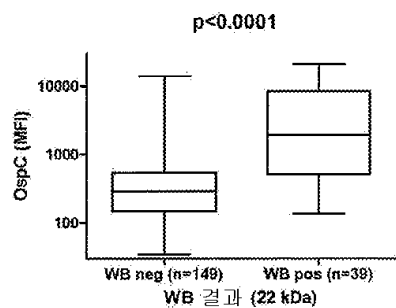
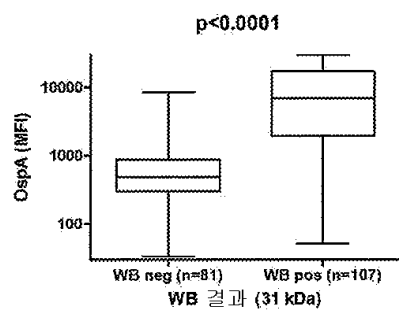
도면2



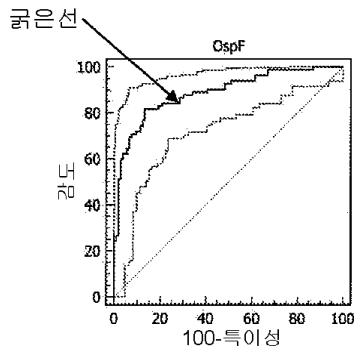
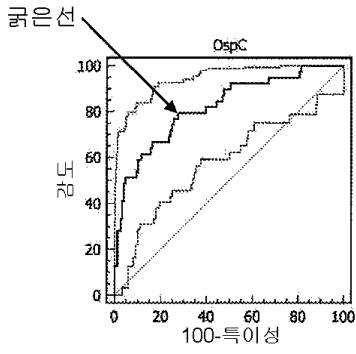
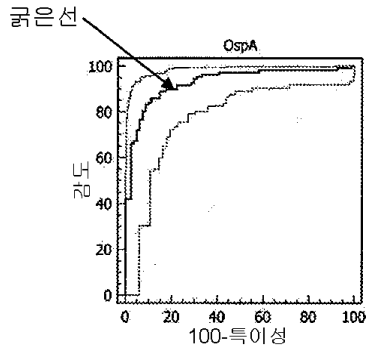
도면3



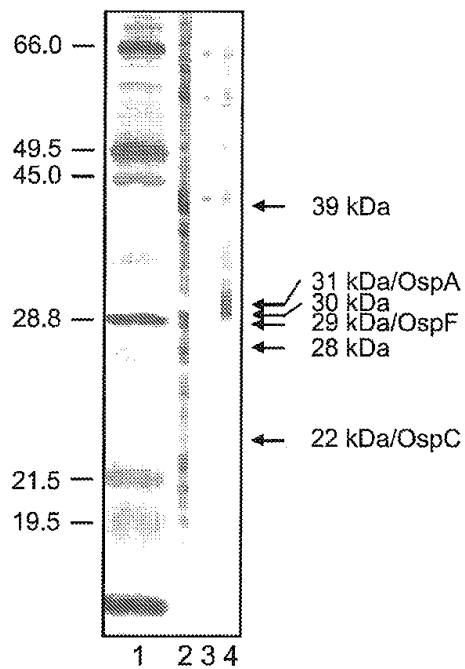
도면4



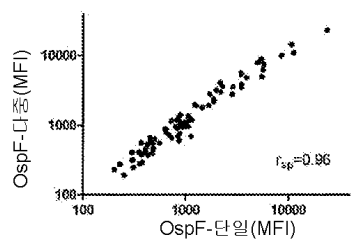
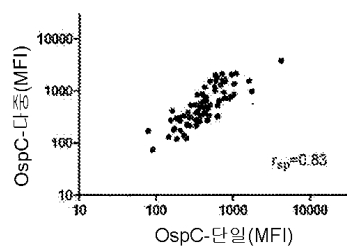
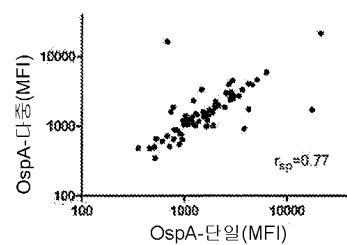
도면5



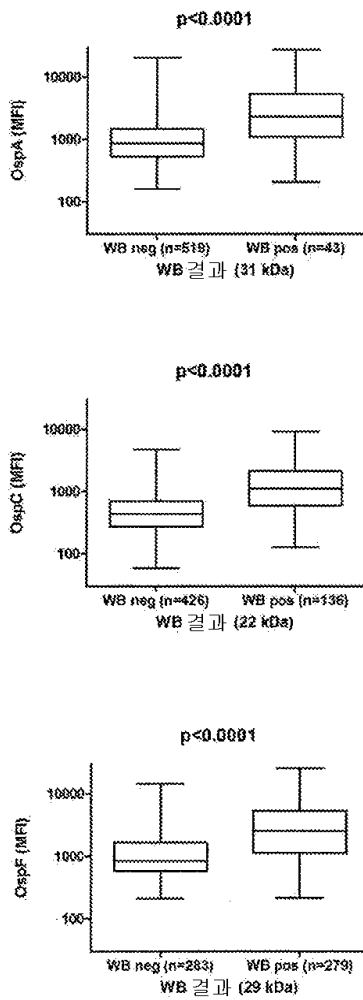
도면6



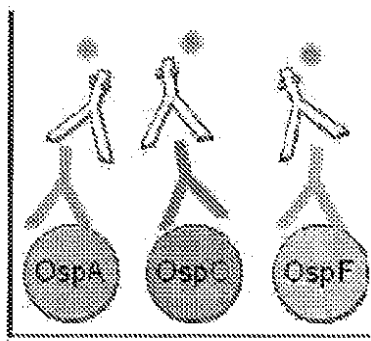
도면7



도면8



도면9



(4) 스트렙타아비딘-피코에리트린 (PE)

(3) 비오틴화된 항-종 특이 Ab

(2) 샘플에서 Abs

(1) 재조합체 비.부르그도르페리
OspA, OspC 및 OspF의 항원은
형광 비드에 결합된다

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Cornell IUniversity

<120> METHODS FOR DIAGNOSING LYME DISEASE

<130> 018617.00320

<150> 61/386,694

<151> 2010-09-27

<160> 19

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 273

<212> PRT

<213> B. burgdorferi

<400> 1

Met Lys Lys Tyr Leu Leu Gly Ile Gly Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ala

1 5 10 15

Cys Lys Gln Asn Val Ser Ser Leu Asp Glu Lys Asn Ser Val Ser Val

20 25 30

Asp Leu Pro Gly Glu Met Lys Val Leu Val Ser Lys Glu Lys Asn Lys

35 40 45

Asp Gly Lys Tyr Asp Leu Ile Ala Thr Val Asp Lys Leu Glu Leu Lys

50 55 60

Gly Thr Ser Asp Lys Asn Asn Gly Ser Gly Val Leu Glu Gly Val Lys

65 70 75 80

Ala Asp Lys Ser Lys Val Lys Leu Thr Ile Ser Asp Asp Leu Gly Gln

85 90 95

Thr Thr Leu Glu Val Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu Val Ser Lys

100 105 110

Lys Val Thr Ser Lys Asp Lys Ser Ser Thr Glu Glu Lys Phe Asn Glu

115 120 125

Lys Gly Glu Val Ser Glu Lys Ile Ile Thr Arg Ala Asp Gly Thr Arg

130 135 140

Leu Glu Tyr Thr Gly Ile Lys Ser Asp Gly Ser Gly Lys Ala Lys Glu

145 150 155 160

Val Leu Lys Gly Tyr Val Leu Glu Gly Thr Leu Thr Ala Glu Lys Thr

165 170 175

Thr Leu Val Val Lys Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Asn Ile Ser
 180 185 190
 Lys Ser Gly Glu Val Leu Val Glu Leu Asn Asp Thr Asp Ser Ser Ala
 195 200 205
 Ala Thr Lys Lys Thr Ala Ala Trp Asn Ser Gly Thr Ser Thr Leu Thr
 210 215 220

Ile Thr Val Asn Ser Lys Lys Thr Lys Asp Leu Val Phe Thr Lys Glu
 225 230 235 240
 Asn Thr Ile Thr Val Gln Gln Tyr Asp Ser Asn Gly Thr Lys Leu Glu
 245 250 255
 Gly Ser Ala Val Glu Ile Thr Lys Leu Asp Glu Ile Lys Asn Ala Leu
 260 265 270

Lys

<210> 2

<211> 211

<212> PRT

<213> B. burgdorferi

<400> 2

Met Lys Lys Asn Thr Leu Ser Ala Ile Leu Met Thr Leu Phe Leu Phe

1 5 10 15
 Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly Asn Thr Ser Ala Asn Ser
 20 25 30
 Ala Asp Glu Ser Val Lys Gly Pro Asn Leu Thr Glu Ile Ser Lys Lys
 35 40 45
 Ile Thr Asp Ser Asn Ala Val Leu Leu Ala Val Lys Glu Val Glu Ala
 50 55 60
 Leu Leu Ser Ser Ile Asp Glu Leu Ala Lys Ala Ile Gly Lys Lys Ile

65 70 75 80
 Lys Asn Asp Gly Ser Leu Asp Asn Glu Ala Asn Arg Asn Glu Ser Leu
 85 90 95
 Leu Ala Gly Ala Tyr Thr Ile Ser Thr Leu Ile Thr Gln Lys Leu Ser

100 105 110
 Lys Leu Asn Gly Ser Glu Gly Leu Lys Glu Lys Ile Ala Ala Ala Lys
 115 120 125
 Lys Cys Ser Glu Glu Phe Ser Thr Lys Leu Lys Asp Asn His Ala Gln

 130 135 140
 Leu Gly Ile Gln Gly Val Thr Asp Glu Asn Ala Lys Lys Ala Ile Leu
 145 150 155 160
 Lys Ala Asn Ala Ala Gly Lys Asp Lys Gly Val Glu Glu Leu Glu Lys
 165 170 175
 Leu Ser Gly Ser Leu Glu Ser Leu Ser Lys Ala Ala Lys Glu Met Leu
 180 185 190
 Ala Asn Ser Val Lys Glu Leu Thr Ser Pro Val Val Ala Glu Ser Pro

 195 200 205
 Lys Lys Pro
 210
 <210> 3
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> B. burgdorferi
 <400> 3
 Met Asn Lys Lys Met Phe Ile Ile Cys Ala Val Phe Ala Leu Ile Ile
 1 5 10 15
 Ser Cys Lys Asn Tyr Ala Thr Ser Lys Asp Leu Glu Gly Ala Val Gln
 20 25 30
 Asp Leu Glu Ser Ser Glu Gln Asn Val Lys Lys Thr Glu Gln Glu Ile
 35 40 45

 Lys Lys Gln Val Glu Gly Phe Leu Glu Ile Leu Glu Thr Lys Asp Leu
 50 55 60
 Asn Lys Leu Asp Thr Lys Glu Ile Glu Lys Arg Ile Gln Glu Leu Lys
 65 70 75 80
 Glu Lys Ile Glu Lys Leu Asp Ser Lys Lys Thr Ser Ile Glu Thr Tyr
 85 90 95

Ser Glu Tyr Glu Glu Lys Leu Lys Gln Ile Lys Glu Lys Leu Lys Gly
100 105 110

Lys Ala Asp Leu Glu Asp Lys Leu Lys Gly Leu Glu Asp Ser Leu Lys
115 120 125

Lys Lys Lys Glu Glu Arg Lys Lys Ala Leu Glu Asp Ala Lys Lys Lys
130 135 140

Phe Glu Glu Phe Lys Gly Gln Val Gly Ser Ala Thr Gly Val Thr Thr
145 150 155 160

Gly His Arg Ala Gly Asn Gln Gly Ser Ile Gly Ala Gln Ala Trp Gln
165 170 175

Cys Ala Asn Ser Leu Gly Leu Gly Val Ser Tyr Ser Ser Ser Thr Gly
180 185 190

Thr Asp Ser Asn Glu Leu Ala Asn Lys Val Ile Asp Asp Ser Ile Lys
195 200 205

Lys Ile Asp Glu Glu Leu Lys Asn Thr Ile Glu Asn Asn Gly Glu Val
210 215 220

Lys Lys Glu

225

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> B. burgdorferi

<400> 4

cgcggtacca tgaaaaata ttattggg 29

<210> 5

<211> 32

<212> DNA

<213> B. burgdorferi

<400> 5

ggcggtacct caagttgaag tgcctgaatt cc 32

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> B. burgdorferi

<400> 6

cgcggtacct ctgtataaa ttcagggaag g 31

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> B. burgdorferi

<400> 7

ggcggtacct caaggttttt ttgactttc tgc 33

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> B. burgdorferi

<400> 8

cgcggtaccc agacgaaaga ttgataaa 29

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> B. burgdorferi

<400> 9

ggcggtacct tattcttttt tgacttctcc 30

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> B. burgdorferi

<400> 10

atgaaaaaga atacattaag tgc 23

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> B. burgdorferi

<400> 11

ttaagggtttt tttaggacttt ctgccac	27
<210> 12	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> B. burgdorferi	
<400> 12	
atgaataaaa aaatgtttat tatttgtgc	29
<210> 13	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> B. burgdorferi	
<400> 13	
ttattctttt ttgacttctc c	21
<210> 14	
<211> 822	
<212> DNA	
<213> B. burgdorferi	
<400> 14	
atgaaaaaat atttattggg aataggctta atattagcct taatagcatg taagcaaat	60
gtttagcagcc ttgacgagaa aaacagcggt tcagtagatt tgcctgggtga aatgaaagtt	120
cttgaagca aagaaaaaaa caaagacggc aagtacgac taattgcaac agtagacaag	180
cttgagctta aaggaacttc tgataaaaac aatggatctg gagtacttga aggcgtaaaa	240
gctgacaaaa gtaaagtaaa attaacaatt tctgacgac taggtcaaac cacacttgaa	300
gttttcaaag aagatggcaa aacactagta tcaaaaaaag taacttccaa agacaagtca	360
tcaacagaag aaaaattcaa tgaaaaaggt gaagtatctg aaaaaataat aacaagagca	420
gacggaacca gacttgaata cacaggaatt aaaagcgatg gatctggaaa agctaagag	480
gttttaaaag gctatgttct tgaaggaact ctaactgctg aaaaaacaac attggtggtt	540
aaagaaggaa ctgttacttt aagcaaaaat atttcaaat ctggggaagt tttagttgaa	600
cttaatgaca ctgacagtag tgctgtact aaaaaaactg cagcttgga ttcgggcact	660
tcaacttta caattactgt aaacagtaaa aaactaaag accttgtgtt tacaaaagaa	720
aacacaatta cagtacaaca atacgactca aatggcacca aattagaggg gtcagcagtt	780
gaaattacaa aacttgatga aattaaaaac gctttaaaat aa	822

<210> 15

<211> 222

<212> PRT

<213> B. burgdorferi

<400> 15

Met Lys Lys Tyr Leu Leu Gly Ile Gly Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ala

1 5 10 15
Cys Lys Gln Asn Val Ser Ser Leu Asp Glu Lys Asn Ser Val Ser Val
20 25 30
Asp Leu Pro Gly Glu Met Lys Val Leu Val Ser Lys Glu Lys Asn Lys
35 40 45
Asp Gly Lys Tyr Asp Leu Ile Ala Thr Val Asp Lys Leu Glu Leu Lys
50 55 60
Gly Thr Ser Asp Lys Asn Asn Gly Ser Gly Val Leu Glu Gly Val Lys

65 70 75 80
Ala Asp Lys Ser Lys Val Lys Leu Thr Ile Ser Asp Asp Leu Gly Gln
85 90 95
Thr Thr Leu Glu Val Phe Lys Glu Asp Gly Lys Thr Leu Val Ser Lys
100 105 110
Lys Val Thr Ser Lys Asp Lys Ser Ser Thr Glu Glu Lys Phe Asn Glu
115 120 125
Lys Gly Glu Val Ser Glu Lys Ile Ile Thr Arg Ala Asp Gly Thr Arg

130 135 140
Leu Glu Tyr Thr Gly Ile Lys Ser Asp Gly Ser Gly Lys Ala Lys Glu
145 150 155 160
Val Leu Lys Gly Tyr Val Leu Glu Gly Thr Leu Thr Ala Glu Lys Thr
165 170 175
Thr Leu Val Val Lys Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Asn Ile Ser
180 185 190
Lys Ser Gly Glu Val Leu Val Glu Leu Asn Asp Thr Asp Ser Ser Ala

195 200 205

Ala Thr Lys Lys Thr Ala Ala Trp Asn Ser Gly Thr Ser Thr

210 215 220

<210> 16

<211> 636

<212> DNA

<213> B. burgdorferi

<400> 16

atgaaaaaga atacattaag tgcaatatta atgactttat ttttatttat atcttgtaat 60
aattcaggga aagatgggaa tacatctgca aattctgctg atgagtctgt taaaggcct 120
aatcttacag aaataagtaa aaaaattacg gattctaatacg cggttttact tgctgtgaaa 180
gaggttgaag cgttgctgtc atctatagat gagcttgcta aagctattgg taaaaaata 240

aaaaacgatg gtagtttaga taatgaagca aatcgcaacg agtcattgtt agcaggagct 300
tatacaatat caaccttaat aacacaaaaa ttaagtaaata taaacggatc agaagggtta 360
aaggaaaaga ttgccgcagc taagaaatgc tctgaagagt ttagtactaa actaaaagat 420
aatcatgcac agcttggtat acagggcggt actgatgaaa atgcaaaaaa agctatttta 480
aaagcaaagc cagcgggtaa agataagggc gttgaagaac ttgaaaagtt gtccggatca 540
ttagaaagct tatcaaaagc agctaaagag atgcttgcta attcagttaa agagcttaca 600
agccctgttg tggcagaaag tcacaaaaaa ccttaa 636

<210> 17

<211> 194

<212> PRT

<213> B. burgdorferi

<400> 17

Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly Asn Thr Ser Ala Asn Ser Ala

1 5 10 15

Asp Glu Ser Val Lys Gly Pro Asn Leu Thr Glu Ile Ser Lys Lys Ile

20 25 30

Thr Asp Ser Asn Ala Val Leu Leu Ala Val Lys Glu Val Glu Ala Leu

35 40 45

Leu Ser Ser Ile Asp Glu Leu Ala Lys Ala Ile Gly Lys Lys Ile Lys

50 55 60

Asn Asp Gly Ser Leu Asp Asn Glu Ala Asn Arg Asn Glu Ser Leu Leu

65 70 75 80
Ala Gly Ala Tyr Thr Ile Ser Thr Leu Ile Thr Gln Lys Leu Ser Lys
 85 90 95
Leu Asn Gly Ser Glu Gly Leu Lys Glu Lys Ile Ala Ala Ala Lys Lys
 100 105 110
Cys Ser Glu Glu Phe Ser Thr Lys Leu Lys Asp Asn His Ala Gln Leu

 115 120 125
Gly Ile Gln Gly Val Thr Asp Glu Asn Ala Lys Lys Ala Ile Leu Lys
 130 135 140
Ala Asn Ala Ala Gly Lys Asp Lys Gly Val Glu Glu Leu Glu Lys Leu
145 150 155 160
Ser Gly Ser Leu Glu Ser Leu Ser Lys Ala Ala Lys Glu Met Leu Ala
 165 170 175
Asn Ser Val Lys Glu Leu Thr Ser Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys

 180 185 190
Lys Pro

<210> 18

<211> 684

<212> DNA

<213> B. burgdorferi

<400> 18

atgaataaaa aaatgtttat tatttgtgct gtttttgcgt tgataatttc ttgcaagaat	60
tatgcaacta gtaaagattt agaaggggca gtgcaagatt tagaaagttc agaacaaaat	120
gtaaaaaaaa cagaacaaga gataaaaaaa caagttgaag gatttttaga aattctagag	180
acgaaagatt tgaataaatt ggatacaaaa gagattgaaa aacgaattca agaattaaag	240
gaaaaaatag aaaaattaga ttctaaaaaa acttctattg aaacatatc tgagtatgaa	300
gaaaaactaa aacaaataaa agaaaaattg aaaggaaagg cagatcttga agataaatta	360
aagggacttg aagatagctt aaaaaagaaa aaagaggaaa gaaaaaaagc tttagaagat	420
gctaagaaga aatttgaaga gtttaaagga caagttggat cgcgcactgg agtaactacc	480
gggcatagag ctggaaatca aggtagtatt ggggcacaag cttggcagtg tgctaatagt	540
ttggggttgg gtgtaagtta ttctagtagt actggtactg atagcaatga attggcaaac	600

aaagttatag atgattcaat taaaaagatt gatgaagagc ttaaaaatac tatagaaaat 660
aatggagaag tcaaaaaaga ataa 684

<210> 19

<211> 168

<212> PRT

<213> B. burgdorferi

<400> 19

Glu Thr Lys Asp Leu Asn Lys Leu Asp Thr Lys Glu Ile Glu Lys Arg

1 5 10 15

Ile Gln Glu Leu Lys Glu Lys Ile Glu Lys Leu Asp Ser Lys Lys Thr

20 25 30

Ser Ile Glu Thr Tyr Ser Glu Tyr Glu Glu Lys Leu Lys Gln Ile Lys

35 40 45

Glu Lys Leu Lys Gly Lys Ala Asp Leu Glu Asp Lys Leu Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Asp Ser Leu Lys Lys Lys Glu Glu Arg Lys Lys Ala Leu Glu

65 70 75 80

Asp Ala Lys Lys Lys Phe Glu Glu Phe Lys Gly Gln Val Gly Ser Ala

85 90 95

Thr Gly Val Thr Thr Gly His Arg Ala Gly Asn Gln Gly Ser Ile Gly

100 105 110

Ala Gln Ala Trp Gln Cys Ala Asn Ser Leu Gly Leu Gly Val Ser Tyr

115 120 125

Ser Ser Ser Thr Gly Thr Asp Ser Asn Glu Leu Ala Asn Lys Val Ile

130 135 140

Asp Asp Ser Ile Lys Lys Ile Asp Glu Glu Leu Lys Asn Thr Ile Glu

145 150 155 160

Asn Asn Gly Glu Val Lys Lys Glu

165