

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

11261

11

2EJ

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

*DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO*

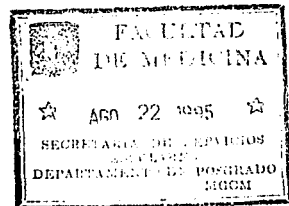
## FALLA DE ORIGEN

**Caracterización Molecular y Expresión Recombinante de p23 (Osp C) :  
Una Proteína de una Cepa de *B. burgdorferi* Aislada en los Estados Unidos  
de América.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA  
EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
AREA INMUNOLOGIA**

**PRESENTA**

**ALICIA SAMPIERI GARCIA**



**TUTOR EXTERNO: DR. STEVEN J. PADULA  
TUTOR: DR. VIANNEY ORTIZ NAVARRETE**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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 está 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.

El presente trabajo fue desarrollado en la División de Reumatología del Departamento de Medicina del Centro de Salud de la Universidad de Connecticut (University of Connecticut, Health Center) en Farmington, Conn., bajo la dirección del Dr. Steven J. Padula y con el apoyo de los Departamentos de Bioquímica, Microbiología Clínica y Microscopía Electrónica.

Los resultados obtenidos en este trabajo fueron publicados en la revista *Infection and Immunity* 1993; 61: 5097-5105 bajo el nombre de "Molecular Characterization and Expression of p23 (OspC) from a North American Strain of *Borrelia burgdorferi*", así mismo, hemos publicado dos artículos posteriores donde se reporta la utilización de la p23 recombinante en el diagnóstico temprano de la enfermedad de Lyme los cuales fueron publicados en las siguientes revistas: "Use of Recombinant OspC from *Borrelia burgdorferi* for Serodiagnosis of Early Lyme Disease", *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32: 1733-1738 y "Recombinant Outer Surface Protein C ELISA for the Diagnosis of Early Lyme Disease", *J. Infect. Dis.* 1995; 171: 724-727 (Ver anexo).

Se agradece a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) a través del Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS) de la UNAM y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado a través de sus programas de beca y beca-crédito, respectivamente, para la obtención del grado académico que aquí se presenta.

## **JURADO**

**Presidente: Dr. Armando Isibasi Araujo.**

**Secretario: Dr. Edmundo Calva Mercado.**

**Primer Vocal: Dr. Vianney Ortiz Navarrete.**

**Segundo Vocal: Dr. Jesús Calderón Tinoco.**

**Suplente: Dr. Vicente Madrid Marina.**

**Suplente: Dr. Juan Pedro Laclette SanRomán.**

## INDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCION</b>	
Antecedentes.....	5
Características clínicas.....	8
Taxonomía, estructura y genética.....	9
Respuestas del huésped.....	13
a).- Respuestas no-específicas.....	13
b).- Respuestas específicas.....	15
Diagnóstico.....	18
<b>JUSTIFICACION.....</b>	<b>23</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	
Cepas de <i>B. burgdorferi</i> y preparación del antígeno.....	26
Aislamiento del ADN genómico.....	26
Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) y electroelución de la proteína.....	27
Transferencia tipo "Western".....	28
Determinación de la secuencia parcial de aminoácidos de p23.....	28
Aislamiento del gen que codifica para p23.....	29
Análisis por transferencia tipo "Northern" (ARN) y del sitio de iniciación de la transcripción.....	30
Expresión de p23 como una proteína fusionada.....	31
Uso de p23 recombinante en ELISA.....	32
Anticuerpos monoclonales a p23.....	33

## RESULTADOS

Caracterización molecular de p23.....	35
Sitio de inicio de la transcripción.....	38
Expresión recombinante de p23.....	42
AcM contra p23.....	45
Defectos moleculares en el gen p23 de la cepa B31.....	45
Uso de p23 recombinante en ELISA para la detección de Ac a <i>B. burgdorferi</i> en el suero de los pacientes.....	50
DISCUSION.....	51
BIBLIOGRAFIA.....	57
ANEXO.....	72

## RESUMEN

La enfermedad de Lyme es generada por la infección generalizada causada por la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*. Debido a que el número de espiroquetas es bajo en los órganos y tejidos infectados, el aislamiento, cultivo y observación directa de la bacteria es difícil, por lo cual el diagnóstico de la enfermedad usualmente depende de pruebas serológicas que confirmen la exposición e infección por el agente etiológico, en pacientes que se presentan con síntomas clínicos característicos.

La falta de estandarización en la preparación del antígeno, las diferencias en la interpretación de los resultados, así como la aparición tardía de la respuesta humoral en este tipo de pacientes y la presencia de anticuerpos contra proteínas de otras bacterias que tienen reacción cruzada con proteínas de *B. burgdorferi*, han hecho el serodiagnóstico complicado.

En los Estados Unidos de América, los estudios por transferencia tipo "Western" de sueros de pacientes en un estado temprano de la enfermedad mostraron que la primera respuesta humoral a *B. burgdorferi* fue una inmunoglobulina de la clase M (IgM), restringida primariamente al antígeno flagelar de 41-kDa. En algunos estudios realizados en los Estados Unidos y otros en Europa se ha reportado la presencia de anticuerpos durante este estado temprano de la enfermedad, que reconocen una proteína de aproximadamente 20-kDa. En nuestra institución, fue observado que los sueros de 78 de 79 pacientes, que tuvieron una reacción IgM positiva por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), reconocieron una proteína de aproximadamente 23-kDa por transferencia tipo "Western", a la cual nosotros le dimos el nombre de p23. Tanto para la transferencia tipo "Western" como para el ELISA, la cepa usada como fuente de antígeno fue *B. burgdorferi* 2591, aislada en el estado de Connecticut y en la que puede observarse una expresión abundante de esta proteína.

Para caracterizar este antígeno inmunodominante, la proteína fue aislada y después de digerirla, se llevó a cabo una secuenciación parcial de dos de los péptidos obtenidos por HPLC. A partir de la secuencia de aminoácidos se diseñaron un par de oligonucleótidos que fueron utilizados para obtener una sonda que sirvió para detectar el fragmento de ADN conteniendo el gen de p23, el cual fue aislado y clonado posteriormente. Este gen resultó ser 83% idéntico en la secuencia de nucleótidos y 75% idéntico en la secuencia de aminoácidos a pC (recientemente renombrada OspC). Esta es una proteína expresada también abundantemente sobre la superficie externa de PKo, la cual es una cepa Europea de *B. burgdorferi* (B. Wilske, V. Preac-Mursic, S. Jauris, A. Hofmann, I. Pradel, E. Soutschek, E. Schwab, G. Will and G. Wanner, Infect. Immun. 61: 2182-2191, 1993). Los estudios llevados a cabo en el microscopio electrónico permitieron localizar a p23 también en la membrana externa, confirmando que p23 es el homólogo de OspC en la cepa 2591. En la cepa B31, aislada también en los Estados Unidos y comúnmente usada en los ensayos serológicos en el diagnóstico de la enfermedad de Lyme, no se observó la expresión de OspC. En el análisis por transferencia tipo "Northern" (ARN) se detectaron bajos niveles de ARNm de OspC en B31, y la secuenciación del ADN de este gen en B31 puso de manifiesto una falta, en comparación con la cepa 2591, de 54-pb en la región reguladora 5', la cual es posiblemente responsable de la baja actividad transcripcional relativa de OspC. La región del gen de OspC de B31 que codifica para la proteína fue clonada y expresada en *E. coli*. El uso de OspC recombinante como antígeno en ELISA para la detección de inmunoglobulinas de la clase M en pacientes con enfermedad de Lyme tiene un futuro prometedor.



## **INTRODUCCION**

### **ANTECEDENTES**

La enfermedad de Lyme, actualmente distribuida en casi todo el mundo (1), es considerada como la enfermedad infecciosa, transmitida por un vector, más común en los Estados Unidos de Norteamérica (2). Se han reportado casos en 43 de los 50 estados que comprende el territorio, aunque la gran mayoría son localizados en 3 áreas específicas: El noreste, que comprende los estados de Maryland a Massachussets, en una región central, Wisconsin y Minnesota, y en el oeste, los estados de California y Oregon (2,3).

Esta enfermedad fue primero diagnosticada como Artritis de Lyme, debido a que se observaron múltiples casos de artritis en esta región del estado de Connecticut (4). Se registró un aumento en el número de pacientes que mostraban una forma característica de artritis, la cual era de corto tiempo, recurrente y típicamente asimétrica, oligoarticular y solo afectaba grandes articulaciones (5). Algunos de los pacientes reportaron la presencia de una lesión en la piel, la cual consistía de un eritema en expansión con un centro claro, antes del desarrollo de la artritis (6). Con base en la revisión de la literatura, se encontró la descripción de casos similares de pacientes desde principios del siglo en Europa y que habían sido picados por la garrapata *Ixodes ricinus*, y la lesión tenía el nombre de Eritema Migratorio Crónico (EMC) (7,8).

La localización en el cuerpo del EMC en el grupo de pacientes de Connecticut, también sugería la transmisión de la enfermedad por la picadura de un insecto o de un arácnido (9). Un nuevo grupo de pacientes reportó la picadura de una garrapata anterior a la aparición del EMC y uno de ellos incluso guardó el organismo y lo llevó a la consulta clínica (9,10). La

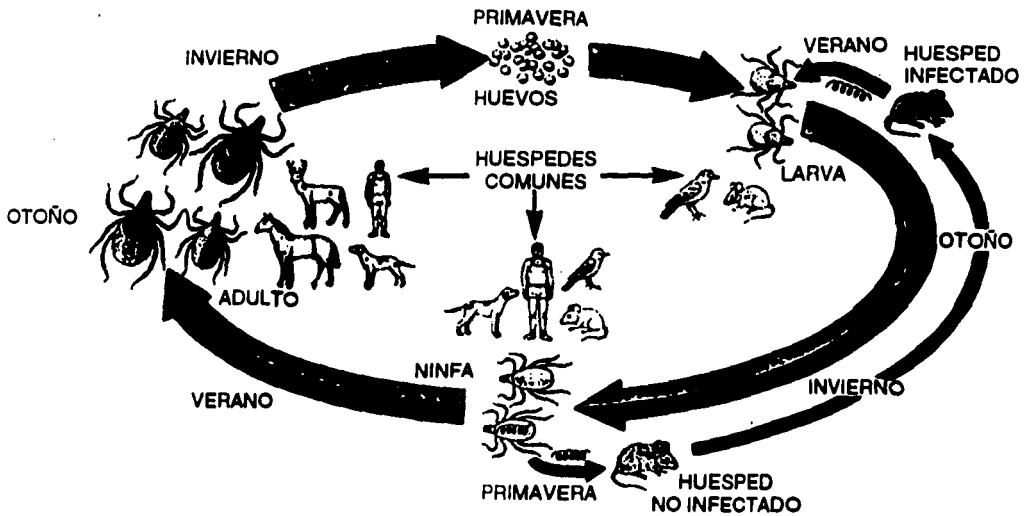


Fig. 1. Ciclo de vida de la garrapata *Ixodes scapularis*. El ciclo de vida de estos organismos es llevada a cabo en un período de dos años e incluye tres fases. El ciclo empieza cuando las hembras depositan los huevos fertilizados en el suelo, de los cuales emergen las larvas y éstas toman su primer alimento de un vertebrado pequeño, usualmente el ratón *Peromyscus leucopus*. En la siguiente primavera o verano, las larvas se vuelven ninfas, las cuales se alimentan del mismo tipo de animales. En el otoño, los adultos emergen y se alimentan por tercera vez y se aparean, situaciones que ocurren frecuentemente sobre el venado de cola blanca. Los machos se mueren inmediatamente después de aparearse y las hembras poco después de depositar los huevos (23).

El aislamiento y cultivo de estas bacterias (18) y su inoculación en conejos, produjo una reacción cutánea similar a la observada en humanos (19). En estudios por inmunofluorescencia indirecta se mostró que el suero de los pacientes con enfermedad de Lyme contenía anticuerpos contra la bacteria (17). Todo esto sugirió que este organismo era el agente etiológico de la enfermedad, idea que fue soportada por el aislamiento subsecuente de la espiroqueta de la sangre y tejidos de los pacientes (19,20).

Pocos años después, en base a su ADN (21), la espiroqueta fue identificada como una nueva especie del género *Borrelia* y, en honor de su descubridor, fue llamada *Borrelia burgdorferi* (22).

### **CARACTERISTICAS CLINICAS**

La artritis de Lyme, ahora conocida como Enfermedad de Lyme, puede producir una gran variedad de síntomas. Aproximadamente 60% de los pacientes presentan el EMC, el cual puede aparecer de 3 días a 1 mes después de la inoculación de las bacterias por el vector (23). Este EMC puede continuar creciendo en diámetro, o bien puede aparecer repetidamente en diferentes partes del cuerpo (24). Es probable que el resto de los pacientes presenten este eritema, pero no sean capaces de registrarlo debido a su localización (23).

De algunos días a semanas después, se puede presentar una variada sintomatología en diferentes pacientes: artralgias, mialgias, fatiga, escalofríos o pérdida del apetito, las cuales semejan una infección por el virus causante de la influenza u otros virus (14). Aparentemente, estos síntomas ocurren cuando las espiroquetas se han diseminado a otros órganos a través del sistema circulatorio (23).

Cerca del 20% de los pacientes que no reciben tratamiento, desarrollan problemas neurológicos como son: parálisis facial, la cual puede ser tanto unilateral como bilateral, meningitis, encefalitis o radiculoneuropatía (23).

Esta enfermedad puede causar también padecimientos cardíacos entre estos pacientes, siendo el más común el bloqueo atrioventricular en 5 a 10% de los casos y, en un porcentaje menor, puede desarrollarse pericarditis y/o miocarditis (23).

Después de 6 meses, un alto porcentaje de individuos que no han recibido tratamiento (80%) tienen problemas de artritis (5), los cuales pueden presentarse en una sola articulación o en varias, pero es predominante en la rodilla (14). Solo el 10% de los pacientes desarrollan un estado crónico (5). En los pacientes de Europa no se ha reportado este tipo de problema, pero pueden desarrollar otra enfermedad conocida como acrodermatitis atrófica crónica, donde la piel es el tejido afectado (23).

No es claro hasta ahora si estas reacciones son provocadas por las bacterias, o si es la respuesta inmune del paciente hacia la espiroqueta el causante de ellas.

## **TAXONOMIA, ESTRUCTURA Y GENETICA**

Las espiroquetas son uno de los pocos grupos de bacterias cuyas relaciones filogenéticas son evidentes a nivel de características fenotípicas y en el caso de la bacteria causante de la enfermedad de Lyme fue automático el clasificarla dentro de este grupo (25). Todas las espiroquetas tienen una forma espiral, con dos o más filamentos axiales internos localizados entre el cilindro protoplásmico y la cubierta externa (Fig. 2A) (25,26). Estos organismos son resistentes al antibiótico rifampicina (27).

La taxonomía de las espiroquetas, a nivel de familia y género, ha sido basada en la estructura, características de crecimiento y composición de nucleótidos del ADN, mientras

que a nivel de especie ha sido llevada a cabo por las manifestaciones de la enfermedad, tropismo por el vector, relación serológica y más recientemente hibridación del ADN (27).

Las características bioquímicas y ecológicas que identifican al género *Borrelia* son: i). Todas las especies en este género son transmitidas a vertebrados por artrópodos hematófagos y ii). El contenido de citosina-guanina del ADN genómico es entre 27 y 32%. Las especies en este género son con frecuencia clasificadas de acuerdo a la especificidad de la relación huésped-parásito (27). Las diferentes especies de borrelias varían en diámetro, grosor de las espirales y número de flagelos en el periplasma (27). *B. burgdorferi* puede tener una longitud de 4 a 30  $\mu\text{m}$  y de 0.18 a 0.25  $\mu\text{m}$  de diámetro (9,27). Dichos parámetros, aparentemente son una función de la edad del cultivo, siendo mayor el tamaño de las células hacia el estado estacionario o también pueden variar dependiendo de los nutrientes en el medio de cultivo o animal experimental en el cual se encuentran creciendo (27). El enrollamiento de la célula es regular y son gram-negativas (27).

Estudiando a las bacterias desde su exterior, encontramos primero la superficie celular, la cual es muy irregular y está formada por una capa de material viscoso heterogéneo. Aparentemente esta capa está constituida por componentes del medio y es eliminada cuando las células son lavadas con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (Fig. 2B) (27).

La siguiente estructura que se observa es la superficie o membrana celular externa, la cual tiene una organización trilaminar característica de todas las membranas citoplasmáticas y su fluidez es observada por el excesivo agrupamiento de las proteínas en los llamados "parches" (27). La composición de estas membranas es de un 45-62% proteínas, 23-50% lípidos y de un 3 a 4% carbohidratos. Entre las proteínas más abundantes de la membrana externa están: OspA (outer surface protein A), OspB y OspC, cuyo peso molecular y antigenicidad varía entre las diferentes cepas aisladas (28).

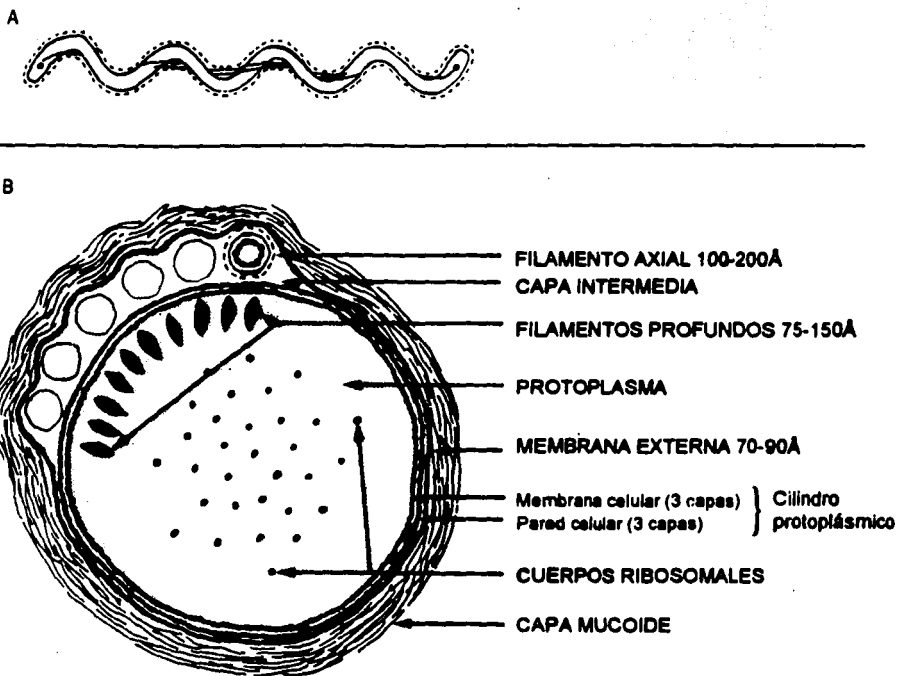


Fig. 2. A) Diagrama de una espiroqueta con un solo flagelo. B) Sección transversal de una espiroqueta mostrando seis flagelos (27).

Un promedio de 7 flagelos periplásmicos, los cuales son estructuralmente iguales a los de otras bacterias, están localizados entre la membrana celular externa y el cilindro protoplásmico, están unidos subterminal y bipolarmente a los extremos de la célula y son los responsables del movimiento rotatorio de la célula (Fig. 2B)(27). Las diferentes especies de borrelias comparten un antígeno que está asociado a los flagelos, el cual puede ser identificado por anticuerpos monoclonales. El peso molecular aparente de esta proteína en *B. burgdorferi* es de 41-kDa (27). El cilindro protoplásmico consiste de una pared celular, la cual está constituida por una capa de peptidoglicanos, la membrana celular interna y el citoplasma (27).

El cromosoma de *B. burgdorferi* es lineal con un tamaño aproximado de 1000 kb. Ningún otro grupo de bacterias se caracteriza por la presencia de un cromosoma lineal (28,29). Aproximadamente 40 genes han sido identificados sobre este cromosoma y entre los que se incluyen: 3 del metabolismo intermedio (*pgk*, *plsC*, *tpi*), 13 que participan en la biosíntesis de macromoléculas (*alaT*, *ileT*, *metG*, *miaA*, *phoS*, *phoT*, *pth*, *rpmH*, *rfa*, *rflB*, *rflA*, *rflB*, *rflC*, *rflD*), 6 para la estructura celular (*fla*, *flgE*, *flgG*, *tmbC*, *p60*, *p100*), 16 para los procesos celulares (*dnaA*, *dnaJ*, *dnaK*, *dnaN*, *ftsA*, *ftsZ*, *gidA*, *gidB*, *groEL*, *grpE*, *gyrA*, *gyrB*, *hipG*, *parE*, *rho*, *mpA*) un gen regulador (*moxR*) (30,31), así como los genes que codifican los potentes inmunógenos *p22A* (32), *p39* (33) y *p83* (34).

Todas las cepas de *B. burgdorferi* estudiadas contienen varios plásmidos lineales y circulares, que pueden variar en tamaño de 2 a varios cientos de kb (35). Entre los genes que han sido localizados en los diferentes plásmidos están los operones *guaA/B* (36), *ospA-ospB* (37), *ospE-ospF* (38) y los genes *ospC* (39,40) y *ospD* (41).

El contenido de guanina más citosina del ADN, en esta especie, ha sido reportado entre 27.3 a 30.5 mol% (21). Los patrones de restricción de los genes de los ARN ribosomales,

electroforesis de proteínas y reactividad con anticuerpos monoclonales han delineado recientemente tres grupos genéticos en *B. burgdorferi* sensu lato y causantes de la enfermedad de Lyme: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* y el grupo VS461 (42).

## **RESPUESTAS DEL HUESPED**

Las primeras evidencias de una respuesta inmune en la enfermedad de Lyme se tuvieron incluso antes de conocer el agente etiológico (43,44,45). La presencia de niveles elevados de inmunoglobulinas de la clase M, crioglobulinas y complejos inmunes circulantes fue observada en 1977 (43). La asociación serológica de pacientes con *B. burgdorferi* fue demostrada cuando la bacteria fue identificada y aislada por primera vez en 1982 (17).

Sin embargo, la patogénesis de esta enfermedad no ha sido hasta el momento bien esclarecida. Entre las respuestas que han sido observadas en estos pacientes, hay tanto procesos inflamatorios no-específicos, como los que ocurren durante el EMC y que aparecen inmediatamente después de la exposición al vector infectado, así como respuestas posteriores tanto por linfocitos B como por linfocitos T.

### **a). Respuestas no-específicas**

Uno de los mecanismos más importantes en la erradicación de un agente infeccioso en el organismo es llevada a cabo por fagocitos (46). Se han observado macrófagos en las lesiones del EMC (47), polimorfonucleares (PMN) y monocitos se encuentran en la sangre durante la fase diseminada de la enfermedad (46), y un gran infiltrado de estas células se encuentra también en el líquido sinovial de los pacientes con artritis (48). No existen observaciones acerca de la interacción de estas células y las espiroquetas *in vivo*; mediante los estudios *in vitro* se han descrito los aspectos básicos de la respuesta del huésped.



La activación del sistema del complemento por la espiroqueta ha sido reportada *in vitro* (49). Tanto estos factores, como proteínas de la bacteria, pueden estar involucrados en la quimiotaxis de las diferentes células fagocíticas. Dos proteínas purificadas de *B. burgdorferi*, OspA y flagelina, produjeron una respuesta quimiotáctica en PMN usando cámaras de Boyden (50). La producción del factor C5a puede también resultar por la formación de complejos inmunes, los cuales han sido detectados en la sangre y líquido sinovial de estos pacientes (45, 51). La fagocitosis de las bacterias por PMN y monocitos ha sido observada tanto en la presencia, como en la ausencia de suero (52,53). Sin embargo, la incubación de *B. burgdorferi* en suero y líquido sinovial aumentó el número de bacterias internalizadas, en periodos de incubación más cortos y en una relación menor de espiroquetas-fagocitos (52,54). La inhibición de la fagocitosis, por tratamiento de los PMN con un anticuerpo monoclonal al receptor Fc o por el pretratamiento de los monocitos con IgG, mostró que este mecanismo es mediado a través de los receptores Fc (52). La activación del complemento y la presencia del factor C3 sobre la superficie de la bacteria, sugiere que los receptores del complemento pueden también ser importantes en la fagocitosis de *B. burgdorferi* (52,54).

Aparentemente, los fagocitos pueden ser ineficientes en la eliminación de un organismo tan largo y tan móvil como lo es *B. burgdorferi*. Diferentes estudios han mostrado que la ingestión de las bacterias puede ocurrir tanto de manera convencional, y ser eliminadas en fagolisosomas (52,55,56), o bien por la formación de pseudópodos que se extienden alrededor del diámetro de la bacteria, en un proceso conocido como fagocitosis segmental. En este proceso hay invaginación de la membrana, agrupamiento de células, formación de células mononucleares sincitiales, y la degradación es llevada a cabo extralisosomalmente en el citosol, con la participación de lisosomas "secretorios" (57,58,59). Se piensa que estas características están relacionadas directamente a la patogénesis de la enfermedad, mientras

que no se conoce la importancia de la presencia de dos tipos de cuerpos de inclusión citoplasmáticos y vesículas exocíticas encontradas (59). Este tipo de fagocitosis, observada de *B. burgdorferi*, está en contradicción con suposiciones previas de que las espiroquetas son primero dobladas de alguna manera, para después ser completamente cubiertas e internalizadas por los fagocitos (52).

Observaciones al microscopio electrónico y de fluorescencia han mostrado que las bacterias no sobreviven dentro de las células fagocíticas (52,59), aunque no concuerdan con otro estudio que ha sido llevado a cabo con una línea de macrófagos murinos (60).

Interleucina 1 (IL-1) ha sido encontrada en el líquido sinovial de pacientes con artritis y *B. burgdorferi* ha estimulado la secreción de esta citocina por monocitos humanos y macrófagos murinos *in vitro* (61,62,63). La presencia de lipopolisacárido (LPS) en los lisados de la bacteria no ha sido consistentemente demostrada, pero una actividad similar producida por LPS ha sido reportada y considerada como la responsable de la respuesta inflamatoria inducida por IL-1 (64,65,66). La producción de esta citocina puede también estar regulada por la fracción de peptidoglicanos proveniente de la pared celular de *B. burgdorferi* (67). Se piensa que la IL-1 contribuye a la producción de los altos niveles de prostaglandina E<sub>2</sub> y colagenasa, observados en cultivos de células del tejido sinovial de un paciente con artritis (68).

#### b). Respuestas específicas

La respuesta de los linfocitos B en la enfermedad de Lyme ha sido ampliamente caracterizada a través de la presencia de anticuerpos circulantes. Diferentes estudios han mostrado que la primera respuesta producida en humanos, infectados por *B. burgdorferi*, son de la clase IgM, y niveles elevados correlacionan con la actividad de la enfermedad (44). IgM específica puede usualmente ser detectada 3 a 4 semanas posterior al inicio de la infección.

alcanza su máximo después de 6 a 8 semanas y declina gradualmente (69,70). Ocasionalmente, los títulos de IgM permanecen elevados a través del curso de la enfermedad. En parte, esta respuesta tardía puede representar una expansión de la respuesta a nuevos antígenos (70). Algunos componentes de *B. burgdorferi* son capaces de estimular la producción de IgM y la proliferación de linfocitos de pacientes y en controles *in vitro*, lo cual sugiere la presencia de una sustancia mitogénica, entre las que puede estar el LPS (71).

La respuesta por IgG e IgA aumenta gradualmente durante el segundo y tercer mes de la infección y, una vez establecida, puede permanecer por años. El tratamiento temprano con antibióticos aborta el desarrollo de una respuesta madura por IgG (70).

Una fuerte respuesta específica por linfocitos T se desarrolla temprano en el curso de la infección, frecuentemente anterior al desarrollo de la respuesta por anticuerpos. Este retraso en la respuesta por linfocitos B podría explicar por qué los anticuerpos contra *B. burgdorferi* no pueden ser detectados tempranamente en la enfermedad (72). La evolución de la respuesta específica por anticuerpos puede ser concurrente con una activación policlonal de los linfocitos B (48).

El análisis de la respuesta inmune celular a través de la proliferación de células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) es aún controvertido. Sigal y colaboradores (73) reportaron inicialmente que algunos pacientes responden muy bien a un sonido de *B. burgdorferi*, mientras que las repuestas son muy bajas en controles sanos, y que pacientes con artritis activa presentan una respuesta más elevada, la cual tiende a disminuir después del tratamiento con antibióticos. En cambio, Zosche y cols., (74) encontraron que una fuerte respuesta puede persistir mucho después del tratamiento satisfactorio, y en los ensayos de proliferación de células mononucleares (CMN) observaron respuestas estadísticamente

elevadas en 8 de las 12 muestras de controles seronegativos y de cordón umbilical. Cuando un paciente fue probado el mismo día que un control, solo en 5 casos la respuesta de los pacientes fue más elevada que en los controles. Recientemente otro grupo de investigadores han observado también estos resultados, los cuales muestran que parte de la respuesta por linfocitos inducida por *B. burgdorferi* no requiere de una exposición previa al antígeno (75). Sin embargo, las respuestas parecen ser siempre más pronunciadas cuando las células son obtenidas de sitios de inflamación, tales como el sinovio o líquido cefalorraquídeo (LCR), en comparación a la respuesta de CMNSP del mismo paciente, o de pacientes con artritis en un estado crónico de la enfermedad (73,74).

Se ha pensado que la diferencia en la magnitud de la respuesta podría ser debida a la preparación del antígeno (70,76) y que la presencia de factores en el suero autólogo también puede ser crucial en la obtención de los resultados (70,77).

La alta frecuencia de formación de colonias de células T dependientes de interleucina 2 en pacientes con enfermedad de Lyme, ha indicado la presencia de células T preactivadas *in vivo*. Así mismo, la autoreactividad de las células T de estos pacientes a CMN irradiadas fue mayor que la de los controles, sin importar el origen de las células (SP vs SF). La presencia de células supresoras a estas células autoreactivas no fue detectada, lo que podría sugerir que la inflamación crónica observada en la enfermedad de Lyme puede ser sostenida por células autoreactivas en la ausencia de mecanismos supresores (78). Estudios histopatológicos y con anticuerpos monoclonales han mostrado un gran infiltrado de células T CD4+ distribuidas difusamente a través de toda el área subsinovial de la membrana y las células T aisladas de estos pacientes responden específicamente a diferentes proteínas de *B. burgdorferi*. Todas estas clonas eran CD3+, CD4+, CD8-, fueron teñidas por anticuerpos dirigidos a las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor de células T, y produjeron TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  y GM-

CSF en respuesta a antígenos de la espiroqueta (79). El análisis de 43 clonas reveló la expresión preferencial de la cadena V $\beta$  5.1 (5 de 15) y la incubación de las CMNSP del paciente mostró un aumento en el número de células expresando este receptor, lo que podría indicar la presencia de un factor selectivo influenciando la respuesta inmune (80).

Es aún poco conocido acerca de los antígenos individuales reconocidos por las células T durante la respuesta inmune. Las respuestas celulares específicas han sido medidas usando OspA, OspB, flagelina, las proteínas de 55/58-kDa y de 66-kDa, las cuales parecen ser proteínas de choque térmico, purificadas por electroelución, o bien con las proteínas o sus fragmentos recombinantes. Los ensayos llevados a cabo con los diferentes antígenos han mostrado resultados muy complejos (81,82). En el análisis de la respuesta, la reactividad no solo estuvo restringida a los pacientes con la enfermedad de Lyme, sino que también fue detectada en los controles y en pacientes con otras enfermedades inflamatorias. De la misma manera, los ensayos con CMN de las muestras tomadas de los pacientes como grupo, mostraron una mayor reactividad a los diferentes antígenos probados, pero analizados individualmente hay una considerable variación en los valores de proliferación en todos los grupos estudiados (82).

## **DIAGNOSTICO**

El diagnóstico de un paciente con enfermedad de Lyme es claro cuando se presenta en un área endémica, con un antecedente de picadura de una garrapata y la presencia del EMC. Sin embargo, es difícil cuando ninguna o sólo una de estas características se presenta, o bien no son advertidas por el paciente o el médico; también puede ser que la sintomatología del segundo estadio, entre las que están artralgias, mialgias, dolores de cabeza, etc., pueda ser fácilmente atribuida a otras causas (14,83).

En estos casos, las pruebas de laboratorio tienen un papel importante en el diagnóstico temprano, ya que el tratamiento adecuado con antibióticos en este periodo, puede prevenir las secuelas potencialmente serias que afectan los sistemas nervioso central y musculoesquelético (84). El aislamiento y cultivo de las bacterias es difícil, debido al bajo número de espiroquetas presentes en las lesiones o fluidos del cuerpo (85).

Actualmente, los métodos más usuales y de más bajo costo son los serológicos, entre los que el ELISA es el más favorecido, ya que al igual que la transferencia tipo "Western", se ha encontrado que es más sensible y específico que la inmunofluorescencia indirecta (86). En los estudios por transferencia tipo "Western", utilizando suero de pacientes en un estado temprano de la enfermedad (3 a 6 semanas), se ha mostrado que una de las primeras respuestas humorales detectables a *B. burgdorferi* es una inmunoglobulina de la clase M (IgM), que está dirigida principalmente al antígeno flagelar de 41-kDa (87). Este componente comparte mucha homología con otras especies de borrelias, por lo que es considerado específico del género (88); más aún, el suero de pacientes con enfermedades causadas por otras espiroquetas contienen anticuerpos que tienen reacción cruzada con este antígeno (88). Los anticuerpos de la clase IgG se desarrollan en un patrón secuencial típico, con reactividad hasta a 11 antígenos diferentes (89).

En el ensayo por ELISA, se ha utilizado como substrato un lisado de *B. burgdorferi*, el cual puede o no ser clarificado por centrifugación, e incluso se ha utilizado la bacteria completa, lo que provoca una falta de estandarización de la prueba. Estudios recientes han utilizado fracciones enriquecidas y formas recombinantes de la proteína de 41-kDa, con la finalidad de mejorar el nivel de detección de la respuesta inmune por anticuerpos (88,90).

En los estudios por transferencia tipo "Western" en Europa, se ha reportado la presencia de anticuerpos en el suero de los pacientes en un estado temprano de la enfermedad, los

cuales están dirigidos a otra proteína de aproximadamente 22-kDa (91,92). En nuestra institución, utilizando la cepa *B. burgdorferi* 2591, también encontramos reactividad IgM dirigida predominantemente a una proteína con un tamaño aproximado de 23-kDa y debido a que esta reactividad es detectada en un estado temprano de la enfermedad, nuestro trabajo ha sido propuesto para el aislamiento y clonación del gen que codifica esta proteína, su obtención recombinante y uso en el diagnóstico serológico de la enfermedad de Lyme (93). Recientemente, realizamos la comparación de 3 métodos de detección de anticuerpos IgM específicos para *B. burgdorferi* en 74 individuos con EMC con cultivos positivos de la bacteria: por ELISA y por transferencia tipo "Western", utilizando el lisado completo de la bacteria y por ELISA, utilizando esta proteína de 23-kDa recombinante y ahora renombrada OspC (OspCr). En todas las pruebas hubo una asociación estadísticamente significativa entre la duración de la enfermedad y la frecuencia de un resultado positivo, la sensibilidad de la transferencia tipo "Western" y de la OspCr fueron equivalentes (aproximadamente 65%) y ligeramente mejores que para el ELISA utilizando el lisado completo de la bacteria (58%). Los resultados de este estudio muestran que el uso de la OspCr en un ELISA es conveniente ya que puede ser rápidamente automatizado y fácilmente estandarizado para el diagnóstico temprano de la enfermedad de Lyme (94).

Hoy, debido al trabajo y tiempo requerido en la realización de una transferencia tipo "Western", muchos laboratorios ofrecen este ensayo para suplementar al ELISA solo en los casos en que es necesario diferenciar los falsos positivos, ya que una transferencia tipo "Western", mostrando anticuerpos a una variedad de proteínas, aumenta la probabilidad de que un individuo sea realmente inmunoreactivo a *B. burgdorferi* (95). Cabe considerar que no hay un acuerdo real acerca del criterio sobre el desarrollo o lectura de las transferencias tipo

"Western", por lo que existe un elemento de análisis cualitativo asociado a su interpretación (95).

Entre otros problemas que han sido observados en el serodiagnóstico de esta enfermedad, es la alta variación de los resultados entre diferentes laboratorios (96,97) y la falta de reproducibilidad en una muestra dada por un solo laboratorio a diferentes tiempos (98,99). Un serodiagnóstico acertado ha sido también complicado por una respuesta humoral retardada y, por lo tanto, los estudios de laboratorio en una etapa inicial de la enfermedad no son de mucha ayuda en el establecimiento del diagnóstico.

Debido a que la respuesta inicial es llevada a cabo por células T, se han propuesto ensayos de proliferación celular como una forma de diagnóstico, pero ya que han sido difíciles de estandarizar, requieren de un intenso trabajo, son técnicamente demandantes y se requieren células frescas, esta metodología no es recomendada en el diagnóstico de rutina (95).

Una de las nuevas metodologías se basa en la detección de los antígenos de la espiroqueta en la orina del paciente y al menos dos pruebas de este tipo están en desarrollo (100); sin embargo, la sensibilidad y la especificidad de estos métodos no han sido bien establecidas (101).

Por último, el análisis por la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) es otra técnica prometedora en la detección directa de *B. burgdorferi*. Por medio de la PCR, se pueden identificar fragmentos de ADN de una composición específica. Esta reacción ha demostrado ser lo suficientemente sensible para identificar un solo organismo *in vitro* o en los vectores (102), mientras en otro estudio se ha reportado que tan poco como 0.01 pg de ADN purificado puede ser suficiente para amplificar algunos genes de la bacteria (103).



Sin embargo, en un estudio para obtener una medida confiable de la sensibilidad diagnóstica de este método, la orina y el LCR de un grupo de pacientes con enfermedad de Lyme fueron evaluados. Los pacientes tenían afectación del sistema nervioso, se encontraban tanto en estados tempranos o tardíos de la enfermedad, y no habían recibido tratamiento. Los resultados mostraron una sensibilidad muy pobre, con solo 20% positivos en el LCR y 50% en la orina de los pacientes, previo al tratamiento. La sensibilidad en orina aumentó a 90% cuando la muestra de orina fue tomada 4 días después del inicio del tratamiento, posiblemente debido a lisis celular y aumento en la excreción de los productos de la espiroqueta (104).

Algunas de las explicaciones a estos resultados son: el bajo número de espiroquetas en los pacientes, así como la presencia de inhibidores de la enzima TAQ polimerasa (104). Hasta hoy, la técnica de PCR no ha alcanzado los parámetros necesarios para considerarla eficiente en el diagnóstico de esta enfermedad (104).

En el análisis final, el diagnóstico descansa sobre parámetros clínicos. Las pruebas de laboratorio, las cuales miden la respuesta de las células B del paciente contra *B. burgdorferi*, antígenos o ADN de esta bacteria, son con frecuencia de ayuda apoyando, el diagnóstico de la enfermedad de Lyme cuando la sospecha clínica es alta.

## JUSTIFICACION

Los estudios por transferencia tipo "Western", en los Estados Unidos de América, habían mostrado que la respuesta humoral temprana (IgM) a *B. burgdorferi* estaba principalmente dirigida al antígeno de 41-kDa. En la mayoría de los laboratorios la cepa usada ha sido la B31.

El tratamiento de los pacientes en una etapa temprana de la enfermedad previene las manifestaciones secundarias que involucran los sistemas nervioso y musculoesquelético, por ello la utilización del antígeno flagelar de 41-kDa como medio diagnóstico fue de mucho interés. Sin embargo, la detección de anticuerpos a este antígeno puede no ser específica para la enfermedad de Lyme, ya que la secuencia de esta proteína flagelar está conservada entre diferentes espiroquetas, lo que da como resultado un alto número de falsos positivos.

En estudios similares de pacientes en Europa, utilizando otras cepas como fuente de antígeno, la reacción por IgM más frecuentemente dirigida a una proteína abundante de 21-22-kDa, la cual se designó pC. Muy pocos estudios han reportado esta proteína en cepas aisladas en los Estados Unidos.

En nuestro grupo se realizó un análisis por transferencia tipo "Western", usando la bacteria completa, y se encontró que de 79 sueros de pacientes con un ELISA IgM positivo, empleando la misma fuente de antígeno, 78 tuvieron anticuerpos que reconocieron una proteína de 23-kDa, a la que denominamos p23. El análisis, clonación y expresión del gen que codifica para p23 es de importancia en el desarrollo de un ensayo más específico y sensible, con muy poca o nula reacción cruzada a otras bacterias. Esto pudiera, en un estado temprano de la enfermedad, aplicar el tratamiento adecuado con antibióticos a pacientes infectados con *B. burgdorferi*, y también se evitaría el uso excesivo de antibióticos en

**pacientes que han sido diagnosticados erróneamente, y el desarrollo de las secuelas secundarias en los pacientes con enfermedad de Lyme.**

## **OBJETIVOS**

- 1.- Obtener una secuencia parcial de aminoácidos de p23 de la cepa 2591 de *B. burgdorferi*.**
- 2.- Clonar y caracterizar el gene de p23.**
- 3.- Subclonar la región codificadora de p23 en un vector de expresión.**
- 4.- Purificar la proteína recombinante.**
- 5.- Producir anticuerpos monoclonales para la localización de p23 en las bacterias.**
- 6.- Evaluar la utilidad diagnóstica de p23.**

## MATERIAL Y METODOS

**Cepas de *B. burgdorferi* y preparación del antígeno.** La cepa *B. burgdorferi* 2591, fue obtenida del Dr. Luis Magnarelli, del Departamento de Entomología, Estación Experimental Agrícola del Estado de Connecticut, en New Haven, Conn. Esta cepa fue originalmente aislada de un ratón *Peromyscus leucopus* atrapado en East Haddam, Conn. (105). La cepa *B. burgdorferi* B31 (cepa tipo), fue obtenida de la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection, Rockville, Md. ATCC 35210). Las bacterias fueron crecidas en medio BSK II (Barbour-Stoener-Kelly II) en un matraz cerrado a 33°C por 10 a 14 días. Las células fueron entonces lavadas 3 veces con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) de Dulbecco (DPBS, GIBCO, Grand Island, N.Y.) y lisadas sobre hielo con un sonicador (Branson, modelo 185, Danbury, Conn.) por 10 periodos de 15 segundos cada uno con un poder máximo del 60%. Este sonicado fue clareado por centrifugación a 10,000 x g a 4°C por 20 minutos. La concentración de la proteína fue determinada por el método de Bradford (106).

**Aislamiento de ADN genómico.** Las espiroquetas lavadas fueron resuspendidas en amortiguador SET (25% de sacarosa, 5 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 7.5) y lisadas con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS, concentración final de 0.05%)-ARNasa A (0.1 mg/ml)-proteínasa K (0.1 mg/ml) e incubación a 37°C por 45 minutos con agitación suave. El ADN fue extraído dos veces con fenol amortiguado (pH 8.0) y una vez con fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1) y precipitado con etanol absoluto.

**Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) y electroelución de la proteína.**

De 40 a 80  $\mu\text{g}$  del lisado de *B. burgdorferi* fueron mezclados con un volumen igual de amortiguador de muestra (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% de glicerol, 2% 2- $\beta$ -mercaptoetanol y 0.001% azul de bromofenol), hervidos por 5 minutos y colocados en pozos (0.8-mm de grosor por 8-mm de ancho) de un gel discontinuo de poliacrilamida al 12% y 0.1% SDS con amortiguadores descritos por Laemmli (107). Estándares de peso molecular incluyeron: miosina (200,000 Da),  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* (116,250 Da), fosforilasa b de músculo de conejo (97,400 Da), albúmina de suero bovino (BSA, 66,200 Da), ovalbúmina de pollo (45,000 Da), anhidrasa carbónica bovina (29,000 Da), inhibidor de tripsina de soya (21,500 Da) y lisosima de huevo de pollo (14,400 Da). Los geles fueron teñidos y fijados con azul de Coomasie (Coomasie brilliant blue R) 0.25% en 50% de metanol-10% de ácido acético y desteñidos con una solución conteniendo 40% de metanol y 10% de ácido acético. Para los geles preparativos, 250 a 825  $\mu\text{g}$  de proteína fueron puestos en un solo pozo (1.5-mm por 140-mm) y la banda correspondiente a p23 fue visualizada por precipitación con cloruro de potasio (KCl 0.1 M frío) y la porción de gel conteniendo dicha proteína fue cortada. Esta proteína fue aislada por electroelución en un sistema "casero", utilizando la mitad de una pipeta de 10 ml, la cual había sido sellada con agarosa al 0.5% en el mismo amortiguador usado en la electroforesis y una bolsa de diálisis cerrada fue colocada en dicho extremo. Una vez en la bolsa de diálisis, la proteína fue dializada sucesivamente con 0.02 M de bicarbonato de amonio-0.1% SDS por 12 horas y 0.1 M de bicarbonato de amonio-0.02% SDS por otras 12 horas, liofilizada y resuspendida en un volumen mínimo de agua. La concentración fue determinada por el ensayo del ácido bicinónico (BCA, Pierce Chemical, Co., Rockford, Ill.)

**Transferencia tipo "Western".** Las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron transferidas a papel de nitrocelulosa, e incubadas con suero o sobrenadantes conteniendo anticuerpos monoclonales (AcM) por una modificación del método de Towbin y cols (108). La transferencia de las proteínas a la nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.) fue hecha en una cámara de transferencia electroforética (Trans-Blot cell, Bio-Rad Laboratories), en un amortiguador de glicina 192 mM, Tris-base 25 mM y 20% de metanol a 0.5 Amps por una hora. Las proteínas transferidas fueron visualizadas por tinción con Ponceau S al 0.5% en 1% de ácido acético glacial. Para evitar la unión no específica al papel, las membranas fueron bloqueadas por incubación por una hora a 20°C en TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) y BSA al 1%. Las membranas fueron lavadas 3 veces con TBST (TBS con 0.05% Tween-20) y entonces incubadas con el suero de los pacientes (1:100 en TBS-BSA al 1%) o sobrenadante de los hibridomas (1:5 en TBS-BSA al 1%) por una hora a 20°C. Después de que las membranas fueron lavadas 4 veces con TBST, fueron incubadas con un antisuero de cabra anti-IgM e IgG de ratón (cadenas pesadas y ligeras), conjugado a fosfatasa alcalina (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, Md.), o contra las cadenas  $\mu$  y  $\gamma$  de las inmunoglobulinas humanas, conjugadas a peroxidasa (Sigma, St. Luis, Mo.). Las membranas fueron lavadas 4 veces con TBST, y los substratos [nitrobluetetrazolio-BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolilfosfato toluidinio) para el conjugado de fosfatasa alcalina, o bien el 3,3'-diaminobenzidina-peróxido de hidrógeno, para el conjugado de peroxidasa], fueron adicionados.

**Determinación de la secuencia parcial de aminoácidos de p23.** La digestión con tripsina fue llevada a cabo de acuerdo a J. Ozols (109), de la manera siguiente: La proteína electroeluida fue liofilizada, resuspendida en 20% de ácido tricloroacético y precipitada a 4°C

por 12 horas. Después de centrifugarla, el precipitado fue resuspendido en 0.5 ml de HCl al 0.2% en acetona fría e incubado a -20°C por varios días. Después de dos lavados con acetona fría, la proteína (aproximadamente 25 µg) fue secada a 20°C y digerida con 0.25 nmol de tripsina (Worthington, Freehold, N.J.) en urea 2.3 M-Tris-HCl, 0.1 M pH 8.06-bicarbonato de amonio, 0.2 M por 24 horas a 20°C. Esta mezcla conteniendo los péptidos, fue sometida a cromatografía líquida de alta presión y de fase reversa (HPLC)(110). El análisis de la secuencia de los péptidos fue llevada a cabo en un secuenciador de fase de gas Applied Biosystems modelo 470A, equipado con un analizador PTH modelo 120A, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

**Aislamiento del gen que codifica para p23.** Los oligonucleótidos degenerados fueron sintetizados con base en la secuencia de aminoácidos de dos péptidos, resultantes de la digestión con tripsina, y por medio de la PCR un segmento de ADN, localizado entre los dos iniciadores, fue amplificado. El iniciador que reconoce la secuencia en la región 5' fue 5'-GT(AT) AAG GAG GT(AT) GA(AG) AC-3', y en la región 3' fue 5'-CC GTT (TC)TG (AG)TT (GATC)GC (GATC)CC-3'. La amplificación fue llevada a cabo en un volumen de 100 µl en un termociclador (MJ Research, Watertown, Mass.) bajo las siguientes condiciones: 94°C por 5 min; 40°C por 1 min, 72°C por 1 min; 94°C por un minuto 38°C por 1 min, 72°C por un minuto por 30 ciclos y 72°C por 5 min para la extensión final. Cada iniciador fue utilizado a una concentración de 0.5 µM y como templado se utilizaron 50 ng de ADN genómico. El buffer de la reacción contenía 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4)(a 25°C), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg de BSA por ml, 0.125 nM de cada uno de los deoxinucleótidos y 2.5 U de Taq ADN polimerasa. El ADN amplificado fue marcado radioactivamente por la técnica al azar (random primer) y usado en una transferencia tipo "Southern" (111) de ADN genómico de *B. burgdorferi* que



había sido tratado con ocho enzimas de restricción. El ADN genómico fue entonces cortado con la enzima de restricción más apropiada, y el fragmento con el tamaño correspondiente fue aislado de la agarosa de bajo punto de fusión y clonado en el plásmido pBS (Stratagene, La Jolla, Calif.) y usado para transformar a las bacterias DH5alpha (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.) Este fragmento amplificado por PCR, y marcado radioactivamente, fue usado como sonda para seleccionar una biblioteca por la hibridación de las colonias. Las colonias positivas fueron crecidas en medio "Superbroth" y el inserto clonado fue secuenciado en ambas direcciones por la reacción de terminación de la cadena por dideoxinucleótidos con la enzima Sequenasa versión 2.0 (112) (U.S. Biochemicals, Cleveland, Ohio).

**Análisis por transferencia tipo "Northern" (ARN) y del sitio de iniciación de la transcripción.** El ARN celular total fue obtenido de las espiroquetas en presencia de dietilpirocarbonato como previamente se ha descrito (113). El ARN (15 µg por camil fue sometido a electroforesis en un gel desnaturizante de agarosa al 1%, que contenía 0.66 M de formaldehído MOPS (ácido morpholine-propanesulfónico), transferido a una membrana de nylon (Nytran; Schleicher & Schuell, Keene, N.H.) e hibridado a un oligonucleótido de 17 bases (5'-CTTTCCTGAATTATTA-3'), complementario a una secuencia que es igual tanto en la cepa 2591 como en la B31. El oligonucleótido fue marcado en el extremo 5' con digoxigenina. La prehibridación y la hibridación fueron llevadas a cabo a 42°C, bajo las condiciones recomendadas por el fabricante (Genius System; Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, Ind.). La membrana fue lavada dos veces con solución salina citrada 6X (SSC, 1X SSC es 0.15 M NaCl y 0.015 M citrato de sodio)-0.05% PPI a 20°C por 5 min cada uno y dos veces a 42°C por 15 min. La inmunodetección del oligonucleótido se llevó a cabo usando

un anticuerpo antidigoxigenina, conjugado con fosfatasa alcalina, y visualizado por quimioluminiscencia de acuerdo a las condiciones del fabricante.

El análisis del sitio de inicio de la transcripción en el gen de p23 fue determinado por el análisis de la extensión de un iniciador, como previamente se ha descrito (114,115). El mismo iniciador de 17 bases, usado previamente en la transferencia tipo "Northern", fue ahora marcado en su extremo 5' con ( $\gamma^{32}\text{P}$ )ATP (Amersham, Arlington Heights, Ill.), usando la enzima T4 polinucleótido cinasa (Bethesda Research Laboratories) y separado de la marca no incorporada con una columna de Sefarosa G25 (Select-D; 5Prime-3Prime, Boulder, Colo.). Tres pmoles del iniciador, marcado, fueron mezclados con 15  $\mu\text{g}$  de ARN en 3  $\mu\text{l}$  de buffer de hibridación (100 mM KCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.3), calentado a 90°C durante 5 min, transferido durante diez minutos a 42°C para permitir la hibridación y finalmente colocado en hielo por 15 min. Un microlitro del amortiguador 5X para la transcriptasa reversa (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 200 mM KCl, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM dithiothreitol, 1 mM de cada uno de los deoxinucleótidos) y 1  $\mu\text{l}$  de la transcriptasa reversa ARNasa H<sup>r</sup> (Superscript; Bethesda Research Laboratories) fueron agregados a la reacción de hibridación e incubada a 42°C por 1 hora. Cinco microlitros de la solución de parar (95% de formamida, 20 mM EDTA, 0.05% azul de bromofenol y 0.05% xylene cyanol FF) fueron adicionados y la mitad del volumen fue colocado en un pozo de un gel de poliacrilamida al 6% para secuenciación. Los tamaños de los productos extendidos fueron determinados por comparación con una secuencia de ADN obtenida con el mismo oligonucleótido de 17 bases y con el plásmido conteniendo el gen p23.

**Expresión de p23 como una proteína fusionada.** El ADN genómico fue usado como template para la amplificación por PCR del gen para p23, con oligonucleótidos diseñados en

base a la secuencia de ADN. El producto fue clonado en el sitio *SmaI* del vector de expresión pGEX-2T (Pharmacia-LKB, Piscataway, N.J.), para que se expresara como una proteína fusionada a la región amino terminal de la glutatión-S-transferasa y, así, facilitar su purificación por afinidad. El gen clonado fue secuenciado para confirmar que se encontraba en un marco de lectura correcto. Las colonias fueron crecidas toda la noche en 2 ml de "Superbroth". Al día siguiente, se les agregó isopropil- $\beta$ -D-thiogalactopiranosido (IPTG; Sigma) a una concentración final de 0.1 mM y se continuó el cultivo por 2 horas más. Al término de ese tiempo, los cultivos fueron centrifugados y el paquete celular fue resuspendido en DPBS frío y sometido a sonicación. El sobrenadante fue clarificado por centrifugación, y 50  $\mu$ l de una suspensión al 50% (p/v) de esferas de agarosa, las cuales tenían glutatión acoplado covalentemente (Sigma), fueron agregados al sobrenadante y mezclado suavemente a 20°C por 10 min. Las esferas fueron lavadas tres veces con DPBS, resuspendidas en el buffer de muestra para un gel SDS-PAGE y corridas en un gel SDS-12% PAGE.

**Uso de p23 recombinante en ELISA.** La proteína p23, fusionada a la glutatión-S-transferasa, fue producida en gran escala de la misma manera que se ha descrito anteriormente, con un paso adicional que es la elución de las proteínas de las esferas de agarosa con 5 mM glutatión reducido (Sigma) en 50 mM Tris-HCl (pH 8.0). Sesenta microlitros de la proteína fusionada (5  $\mu$ g/ml) en DPBS fueron puestos en pozos alternados de una placa para ELISA con fondo plano (Nunc-Immunoplate; Marsh Biomedical Products, Rochester, N.Y.); y una cantidad equimolar de la proteína glutatión-S-transferasa (proteína acarreadora), diluida en DPBS, fue agregada como un antígeno control a los pozos sobrantes. Estas placas fueron incubadas por 12 horas a 4°C y luego bloqueados durante

una hora a 37°C, con 200 µl de 0.05% de suero de caballo y 0.02% de dextran sulfato en DPBS. Las placas fueron lavadas seis veces con DPBS con 0.05% Tween-20 (DPBST). Los sueros de los pacientes fueron serialmente diluidos en múltiplos de dos, empezando en 1:20 hasta 1:1,280 en DPBST. Los sueros control, tanto positivos como negativos, fueron incluidos en cada placa. Después de colocar los sueros, las placas fueron incubadas por 1 hora a 37°C y entonces lavadas seis veces con DPBS. El segundo anticuerpo usado fue IgG de cabra anti-IgM humana ( $\mu$  específico), conjugado a peroxidasa (Sigma), y diluido en DPBST. Para detectar los hibridomas positivos, se utilizaron anticuerpos de cabra, de los cuales se obtuvieron los fragmentos  $F(ab')_2$ , los cuales estaban dirigidos a IgG e IgM de ratón, conjugados a peroxidasa en los sobrenadantes con ActM (Tago, Burlingame, Calif.) Sesenta microlitros del substrato [volúmenes iguales de 2,2'-azino-di-(3-etilbenzthiazolin sulfonato) y peróxido de hidrógeno; Kirkegaard and Perry] fueron adicionados a cada pozo. Las placas fueron leídas espectrofotométricamente a 414 nm, hasta que la lectura de la densidad óptica (OD) de la dilución 1:160 del control positivo, en el pozo conteniendo la proteína fusionada, menos la lectura del mismo suero a la misma dilución, en el pozo conteniendo la proteína acarreadora, fue de 0.5. Las placas fueron entonces leídas inmediatamente. Una dilución de un suero fue considerada positiva si la absorbancia neta (OD del pozo conteniendo la proteína fusionada menos la OD del pozo conteniendo la proteína acarreadora) era 3 desviaciones estándar, o más arriba de la absorbancia media de los pozos de los controles negativos.

**Anticuerpos monoclonales a p23.** Los anticuerpos monoclonales fueron producidos por fusión de células de bazo de un ratón hembra Balb/c (4 a 8 semanas de edad) a las células NSO/1. El ratón fue inicialmente inmunizado con 200 µg de la proteína fusionada en DPBS,

emulsificada con un volumen igual de adjuvante completo de Freund (Difco Laboratories, Mich.) y suplementada con 5 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* disecado (Difco). Los ratones recibieron 5 reinyecciones intraperitoneales de 100 µg de la proteína fusionada, disuelta en DPBS, cada 2 semanas. Tres días después de la última inyección, los bazo fueron extraídos y una suspensión de células fue obtenida, al pasar los tejidos por una malla fina de acero. Los hibridomas fueron obtenidos de acuerdo a la técnica previamente descrita (116). La fusión fue llevada a cabo con 50% (p/v) de polietilenglicol 1500 (Boehringer Mannheim) en HEPES 75 mM (ácido N-hidroxiletilpiperazina-N'-2-etanosulfónico) (pH 8.01), a una proporción de células de bazo-mieloma de 5:1. Las células fueron inicialmente puestas a una concentración de  $5 \times 10^4$  células de mieloma por pozo, en una placa de 96 pozos con fondo plano (Costar, Cambridge, Mass.). Los hibridomas fueron seleccionados por crecimiento en 14 días en medio completo (Medio Eagle modificado de Dulbecco conteniendo 4,500 mg de D-glucosa por litro (GIBCO) 2 mM L-glutamina, 100 U de penicilina G por ml, 100 µg de estreptomina por ml, 10% NCTC 109,  $5 \times 10^{-6}$  M 2-β-mercaptoetanol, y 10 mM HEPES), suplementado con 20% (vol/vol) de suero bovino fetal (GIBCO) y HAT ( $10^{-4}$  M hipoxantina,  $4 \times 10^{-7}$  aminopterina,  $1.6 \times 10^{-6}$  M timidina; Sigma). Posteriormente, las células fueron crecidas en medio completo con 20% de suero bovino fetal. Los sobrenadantes de los pozos que contenían hibridomas fueron seleccionados por reactividad con la proteína de fusión, pero no con la proteína acarreadora por ELISA. Los hibridomas de los pozos que contenían anticuerpos contra la proteína p23 fueron clonados dos veces por dilución limitante, en placas de 96-pozos, usando células de timo de ratones Balb/c (un timo por 60 pozos) como células alimentadoras.

## RESULTADOS

**Caracterización molecular de p23.** Cuando el sonicado de la cepa 2591 se analizó por PAGE-SDS teñido con azul de Coomassie se observó la expresión abundante de una proteína (p23) con una movilidad correspondiente a una masa molecular de aproximadamente 23-kDa. (Fig. 3A, línea A). Al examinar el patrón de proteínas de la cepa *B. burgdorferi* B31, una cepa comúnmente usada en el diagnóstico de la enfermedad, no mostró la presencia de esta proteína. (Fig. 3A, línea B). Las dos cepas habían sido crecidas bajo las mismas condiciones de cultivo. La transferencia tipo "Western" de estos patrones electroforéticos, con el suero de un paciente con enfermedad de Lyme en un estado temprano, presentó una fuerte reactividad IgM al antígeno flagelar de 41-kDa y fue relativamente tenue a las proteínas de 37, 39 y 75-kDa, en ambas cepas (Fig. 3B). Sin embargo, sólo en el sonicado de la cepa 2591 hubo una reactividad IgM detectable a la proteína de 23-kDa (Fig. 3B, carril A). Ninguna banda adicional fue observada en la línea conteniendo el sonicado de la cepa B31 (Fig. 3B, carril B).

En un intento inicial para obtener la secuencia parcial de aminoácidos de p23 por microsecuenciación, las proteínas de la cepa 2591 fueron transferidas a una membrana de PVDF (Polivinilidendifluoruro, Millipore, Corp. Bedford, Mass.) (117), pero la porción aminoterminal se encontró bloqueada. La proteína fue purificada de un gel PAGE-SDS preparativo por electroelución y utilizada para digestión y aislamiento de los fragmentos internos de la proteína para secuenciación. Una fragmentación inicial se llevó a cabo con bromuro de cianógeno; sin embargo, no se detectó un cambio significativo en la movilidad de p23 por PAGE-SDS (Fig. 4). Por lo tanto, la proteína fue entonces digerida con tripsina, y dos de los péptidos de los fragmentos resultantes fueron aislados por HPLC y secuenciados (las

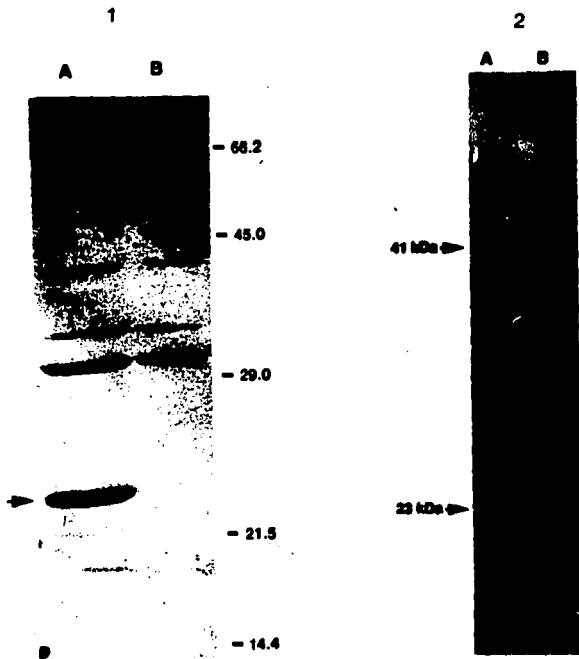
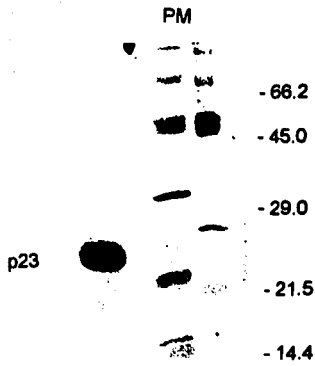


Fig. 3. (1) Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomasie y (2) transferencia tipo "Western" de un sonicado de *B. burgdorferi* 2591 (carril A) y B31 (carril B). En A, la flecha indica la banda de la proteína correspondiente a p23 y los marcadores de peso molecular (en kilodaltons) son mostrados sobre la derecha. En B, se utilizó un suero de un paciente con enfermedad de Lyme en una etapa temprana como primer anticuerpo y como segundo un anticuerpo de cabra anti-IgM humana, conjugado a peroxidasa. Las dos flechas muestran las bandas correspondientes a la proteína flagelar de 41-kDa y la proteína de 23-kDa (p23).



**Fig. 4. Digestión de p23 con bromuro de cianógeno.** La proteína p23 electroeluida de un gel de poliacrilamida fue sometida a digestión con bromuro de cianógeno por 4 horas e inmediatamente después a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 15%. La movilidad aparente de esta proteína no fue modificada, por lo que no pudo ser utilizada para secuenciación.



secuencias de los péptidos, p1 y p2 son mostrados en la Fig. 5). Esto permitió la síntesis de un par de oligonucleótidos degenerados en una orientación adecuada para la amplificación por PCR de un producto de 107-pb del ADN genómico de la cepa 2591. Este fragmento fue marcado radioactivamente y usado como sonda para detectar y clonar un fragmento PstI de 3-kb (Fig. 6) en el plásmido pBS. En el análisis por secuenciación de este fragmento de ADN de 3-kb, se identificó un marco de lectura abierto para la traducción de una proteína de 212 aminoácidos con una masa aproximada de 22,250 Da (Fig. 7 y 8). El hecho de que esta secuencia deducida tuviera una región de completa identidad con la secuencia de ambos péptidos, confirmó que correspondía al gen que codifica para p23, así mismo, la comparación de estos dos péptidos, con la secuencia recientemente publicada del gen para la proteína pC de la cepa europea de *B. burgdorferi* PKo mostró un alto grado de homología (Fig. 8) (118). La comparación de p23 de la cepa 2591, con pC de la cepa PKo mostró un 83% de identidad en la secuencia de nucleótidos y 75% de identidad en la secuencia de aminoácidos (Fig. 8). Estos resultados demostraron que la p23 es homóloga a la proteína pC aislada en Europa, y las diferencias entre las dos proteínas representan divergencia entre las cepas.

La secuenciación adicional de la región de 185-pb, corriente arriba del codón de inicio de la traducción AUG para la proteína p23 (Fig. 7), reveló la secuencia de un posible promotor conteniendo las secuencias consenso de los hexámeros -35 y -10 de *E. coli* (119), separadas por 17-pb, así como también una secuencia consenso del sitio de unión al ribosoma (120), localizada 9-pb 5' al codón de iniciación de la traducción.

**Sitio del inicio de la transcripción.** Para confirmar si la secuencia del posible promotor identificado era el sitio activo para la transcripción de p23, se llevó a cabo el análisis de la

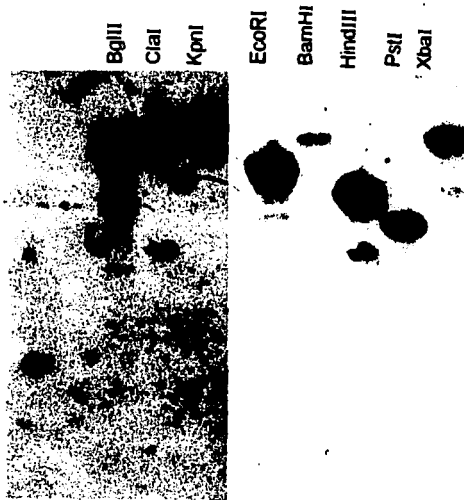
**PEPTIDO 1**

**Val-Glu-Thr-Leu-Leu-Ala-Ser-Ile-Asp-Glu-Val-Ala-Lys-Lys**

**PEPTIDO 2**

**Ala-Ile-Gly-Asn-Leu-Ile-Ala-Gln-Asn-Gly-Leu-Asn-Ala-Gly-Ala-Asn-  
Gln-Asn-Gly-Ser-Leu-Leu-Ala-Gly-Ala-Tyr-Val-Ile-Ser-Thr-Leu-Ile**

**Fig. 5. Secuencia de los péptidos 1 y 2 obtenidos por digestión con tripsina y separados por HPLC.**



**Fig. 6. Transferencia tipo "Southern" del ADN genómico de *B. burgdorferi* digerido con varias enzimas. El ADN genómico de *B. burgdorferi* 2591 fue sometido a digestión con 8 diferentes enzimas de restricción, separado en un gel de agarosa al 1%, transferido a una membrana de nylon donde fue hibridado al fragmento de PCR de 107-pb que contenía el ADN que codifica para los péptidos p1 y p2 del gen de *p23*. La digestión con PstI resultó ser el fragmento más pequeño y único en la digestión, por lo que fue el más apropiado para clonación.**

```

2591: MKKNTLSAILMTLFLFISCNNSGKDG-NTSANSADSVKGPNLTEISKKITESNAVVLAVKEVETLLASIDE 71
      |||
E31: .....D.....L.....A.....C.....
      |||
PKo: .....G*DSA*T*P.....A.....D.....F.....VL.....

2591: VAKKAIGNL-IAQN-GLNAGANQNGSELLAGAYVISTLIAEKLDGLKNSEELKEKIEDAKKCNKAFTDKLKES 141
      |||
E31: I*A.....KK*H*N*DTEN*H*.....A.....KQ*.....G.....DA*SET*N*EK
      |||
PKo: L*.....QKIDNN*.....A*LN*.....A.....T*SK*...L*...TE*AK*...SEE*N*...G

2591: HAELGIANGAATDANAKAAJLKTNGTKDKGAQELEKLFESVKNLSKAAQETLNNVSKELTSPVVAENPKPK 212
      |||
E31: *TD*...KEGV*...D*E*...E*G*...EV*...K*M*A*...S*...
      |||
PKo: *D*...KQD*...DH*...HA*T*...K*FKD*...EG*L*...VA*T*...S*...

```

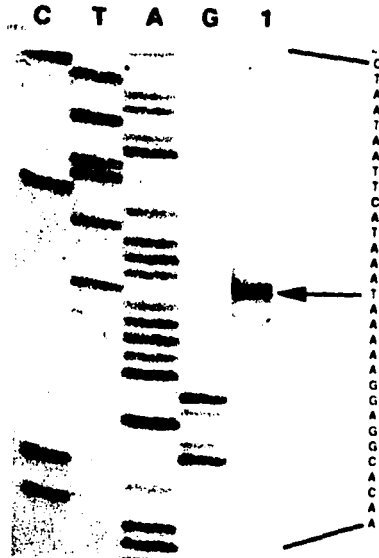
Fig. 7. Secuencia de nucleótidos del gen *p23* de la cepa 2591 y secuencia de aminoácidos deducida, esta última es mostrada en códigos de una sola letra. Las secuencias de los dos péptidos obtenidos (p1 y p2) de la digestión por tripsina y purificación por HPLC son señalados con flechas arriba de las secuencias. Se muestran los hexámeros consenso -10 y -35 del promotor similares al de *E. coli* y el sitio consenso de unión al ribosoma está señalado con una línea oscura. La flecha apuntando hacia abajo señala el sitio de iniciación transcripcional determinado por el análisis de la extensión de un iniciador. La secuencia entre las dos pequeñas flechas (posiciones de nucleótidos 60 a 113) corresponde a la falta encontrada en la cepa B31. La secuencia complementaria al oligonucleótido de 17 bases usado para los análisis de extensión del iniciador y transferencia tipo "Northern" es mostrado en letras oscuras (posiciones de nucleótidos 242 a 258). El codón de terminación (TAA) está marcado con un asterisco.

AGGGAATTTAGCATATTTGGCTTTGCTTATGTCGATTTTAAAAATCAAATTAAGTCAATATTTTCAAATTTCTCAATTT 80  
 TATTCATATATATTGAATAAATTGAAAAAATATTTTTTCAAATAAAAAATGAAAAACAAAATGTTGGACTAATAATTC 160  
 ATAAAATAAAAGGAGGCACAAAATTAATGAAAAAGAATACATTAAGTGCATATTAATGACTTTATTTTTATTATATCTT 240  
 M K K N T L S A I L M T L F L F I S C  
 N N S G K D G N T S A N S A D E S V K G P N L T E I  
 GTAATAATTCAGGGAAAGATGGGAATACATCTGCAAAATCTGCGATGAGTCTGTTAAAGGCCTAATCTTACAGAAAA 320  
 S K K I T E S N A V V L A V R E V E T L L A S I D E V  
 AGTAAAAAATACAGAAATCTAACGCAGTTGTTCTCGCCGTGAAGAAGTTGAACTCTGCTTGCATCTATAGATGAAGT 400  
 A K K A I G N L I A Q N G L N A G A N Q N G S L L A G  
 TGCTAAGAAAAGCTATTGGGAATTTGATAGCCCAAAATGGTTAAATGCCGGTCTAATCAAAACGGATCATTTGTAGCGG 480  
 A Y V I S T L I A E K L D G L K N S E E L K E K I E  
 GAGCTACGTAATATCAACCCTAATAGCAGAAAAATTAGATGGATTGAAAAATTCAGAGAATAAAAGGAAAAAATTGAA 560  
 D A K K C N K A F T D K L R S S H A E L G I A N G A A  
 GATGCTAAAAAATGTAACAAAGCATTACTGATAAACTAAAAAGTAGTCATCGGAACTCGGTATAGCGAATGGAGCTGC 640  
 T D A N A K A A I L K T N G T R D K G A Q E L E K L F  
 TAGTGATGCTAATGCAAAAGCGGCTATTTAAAAACAAATGGTACTAAAGATAAGGGTGCTCAAGAGCTTGAAAAGTTAT 720  
 E S V K N L S K A A Q E T L N M S V K E L T S P V V  
 TTGAATCAGTAAAAACTGTGCAAAAGCAGCTCAAGAACTAAATAATTCAGTTAAAGAACTTACAAAGTCTCTGTTGTG 800  
 A E N P K K P \*  
 GCAGAAAATCCAAAAAACCTTAA 824

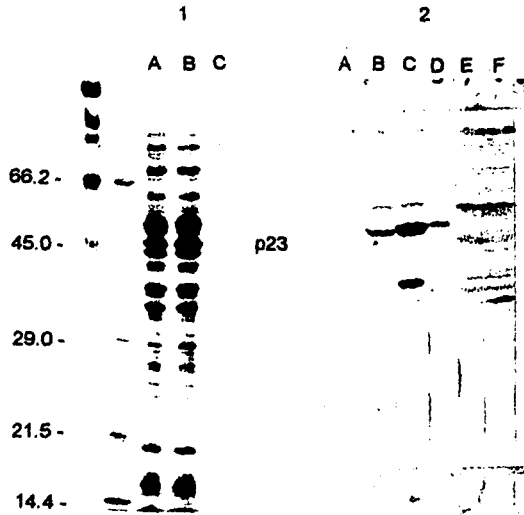
**Fig. 8. Comparación de la secuencia de aminoácidos de OspC (p23 y Pc) de tres cepas diferentes de *B. burgdorferi*.** Esta representación en códigos de una sola letra corresponde a la secuencia de aminoácidos deducida con base en la secuenciación del ADN genómico de las cepas 2591 (este trabajo y ref. 93), B31 (este trabajo y ref. 93) y PKO (ref. 118). La identidad en la secuencia en B31 y PKO con 2591 está indicada con un asterisco abajo de la posición designada, las sustituciones están representadas por el cambio con la letra apropiada y los espacios marcados como (-) han sido incluidos para optimizar la similitud entre las proteínas.

extensión de un iniciador (primer extension), para conocer el sitio exacto del inicio de la transcripción (Fig. 9). Para esto fueron utilizados un iniciador de 17 bases y ARN de la cepa 2591. El sitio del inicio de la transcripción de *p23* fue mapeado 20-pb corriente arriba del codón de inicio de la traducción AUG y 7-pb 3' del hexámero -10 (Fig. 7). Una exposición más prolongada del autoradiograma no mostró la presencia de otros transcritos más largos, sugiriendo la ausencia de otros promotores que contribuyan a la actividad transcripcional del gen *p23 in vitro*.

**Expresión recombinante de la proteína p23.** Conociendo la secuencia completa del gen que codifica para *p23*, un par de oligonucleótidos fueron sintetizados para amplificar *p23* por PCR y a partir del ADN genómico de la cepa 2591, para su expresión en forma recombinante. Para evitar dificultades durante el aislamiento de la proteína expresada, los iniciadores fueron seleccionadas de tal manera que los 20 residuos de aminoácidos que componían el péptido líder no estuvieran presentes en el producto recombinante final (120,121). El producto amplificado codificando a *p23* fue colocado en el marco de lectura, con la proteína acarreadora presente, en el vector de expresión pGEX-2T. Después de la inducción con IPTG, una proteína de fusión de aproximadamente 46-kDa fue obtenida (Fig. 10). La proteína de fusión fue purificada del cultivo de *E. coli* por sonicación de las bacterias, la eliminación de los restos celulares por centrifugación, e incubación del sobrenadante con esferas de agarosa que contenían glutatión, al cual la proteína acarreadora se une. Para confirmar la identidad de la reactividad inmunológica de la *p23* nativa y la *p23* recombinante, el suero de un paciente con una fuerte reactividad IgM a *p23* fue adsorbido con la proteína de fusión, unida a las esferas de agarosa y subsecuentemente analizado en una transferencia



**Fig. 9. Determinación de la región 5' del ARNm de *B. burgdorferi* 2591 por análisis de la extensión de un iniciador.** El nucleótido de inicio del ARNm de p23 usando un iniciador y transcriptasa reversa fue comparado con el ADN genómico secuenciado de esta proteína. El análisis fue llevado a cabo como se describe en material y métodos. Las líneas C, T, A y G representan las reacciones de secuenciación con los dideoxinucleótido trifosfato apropiados y usando el mismo oligonucleótido de 17 bases usado para la extensión del iniciador. La línea 1 muestra el producto obtenido de este análisis, mientras que la secuencia a la derecha son los productos de la región 5' del ARNm de p23. La flecha indica el residuo de esta región donde empieza el ARNm.



**Fig. 10. Expresión de p23 recombinante.** El gen sin la región del líder que codifica para p23 fue amplificado por PCR y clonado en el vector de expresión pGEX-2T, el cual fue usado para transformar *E. coli* y producir una proteína fusionada a la glutatión-S-transferasa de aproximadamente 46-kDa. Esta proteína fue aislada por afinidad con glutatión acoplado a esferas de agarosa. En 1A, se muestra un lisado completo de *E. coli* sin inducir, en 1B, el lisado de la bacteria después de una inducción de 2 horas y en 1C, la proteína recombinante purificada. En 2 se presenta una transferencia tipo "Western" de estos lisados en el mismo orden (A, B, C), el suero de un paciente con reactividad IgM para la proteína nativa fue usado como primer anticuerpo. En 2D, E, F, se presenta una transferencia tipo "Western" con las mismas condiciones para A, B, y C, pero las bacterias usadas en los lisados contenían el plásmido sin inserto.

tipo "Western", usando la proteína nativa contenida en el sonicado total de *B. burgdorferi* 2591. Como controles, el suero fue también adsorbido con las esferas de agarosa-glutación solas y con las esferas de agarosa conteniendo la proteína acarreadora solamente. En la Fig. 11, se muestra que solamente la adsorción con las esferas de agarosa, conteniendo a la proteína de fusión, eliminó completamente la reactividad del suero a p23 en la transferencia tipo "Western". Esta adsorción no afectó la reactividad del suero a otras proteínas presentes en la membrana.

**AcM contra p23.** Las células del bazo de un ratón, inmunizado con la proteína de fusión conteniendo p23 fueron usadas para la obtención de hibridomas productores de AcM a p23. Los sobrenadantes de los hibridomas fueron seleccionados por ELISA para la producción de Ac, que reaccionaron solamente con la proteína de fusión pero no con la proteína acarreadora. Los anticuerpos de varias clonas mostraron una fuerte reactividad tanto a la proteína p23 fusionada, como a la proteína p23, por transferencia tipo "Western". Como puede observarse en la Fig. 12, p23 fue encontrada expresándose sobre la membrana externa de la espiroqueta. El sobrenadante de una de estas clonas, 4D7F5, fue usado para determinar la localización de p23 en *B. burgdorferi* por microscopía electrónica. Como control, un anticuerpo con el mismo isotipo no mostró unión a las espiroquetas (datos no mostrados). Este AcM 4D7F5, no reconoció la proteína en la cepa B31, mostrando la ausencia de p23 en esta cepa (datos no mostrados).

**Defectos moleculares en el gen p23 de la cepa B31.** La falta de reactividad de los sueros de los pacientes y de los AcM, tanto a la proteína en los sonicados como en el organismo completo de *B. burgdorferi* B31, nos hizo investigar la razón a nivel molecular de





**Fig. 11. Remoción de la reactividad IgM anti-p23 del suero por adsorción con p23 recombinante.** En esta transferencia tipo "Western" usando un sonicado de *B. burgdorferi* 2591, se detectó la IgM del suero de un paciente después de ser adsorbido con esferas conteniendo glutatión solamente (A), o con las esferas con glutatión y la proteína acarreadora (glutatión-S-transferasa) (B), ambas líneas muestran una fuerte reactividad a p23 nativa. En (C) no se muestra esta reactividad ya que hubo una completa adsorción de esta reactividad de IgM en el suero por la proteína p23 recombinante adsorbida a las esferas de agarosa-glutatión. La reactividad a otras proteínas incluyendo a la proteína flagelar de 41-kDa no fue afectada.



**Fig. 12. Fotografía al microscopio electrónico de un corte fino de *B. burgdorferi* 2591 que ha sido incubada con un AcM con reactividad a p23, 4D7F5. La localización de este anticuerpo en la bacteria fue llevado a cabo con anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugado a esferas de oro de 10-nm de diámetro. Esta reacción se observa localizada sobre la superficie externa de la bacteria. La barra corresponde a 0.1  $\mu\text{m}$ .**

este fenómeno. El análisis por transferencia tipo "Northern" del ARNm mostró una fuerte cantidad de un transcrito de aproximadamente 700-pb en la cepa 2591, y una muy leve señal del mismo tamaño en la cepa B31 (Fig. 13). La cantidad de ARN total de cada cepa había mostrado ser equivalente en la tinción del gel con Bromuro de Etidio, y no se observó una degradación apreciable del ARN. El análisis de la extensión de un iniciador también sugirió una significativa reducción en la cantidad de ARNm de p23 en la cepa B31 (datos no mostrados). Se encontró también que el tamaño del producto terminado, en la extensión del iniciador en la cepa B31, era 1 base más largo que el transcrito en la cepa B31 (datos no mostrados), para entender un poco más la razón de la falta relativa en la expresión de p23 por la cepa B31, decidimos clonar y secuenciar el gen de p23 de la cepa B31. Lo hicimos de la misma manera como lo habíamos hecho con la cepa 2591. La comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de las cepas 2591, B31 y de pC de la cepa PKo es mostrada en la Fig. 6. Así, se encontró que p23 de la cepa B31 contenía 210 aminoácidos, 2 menos que los otros dos homólogos y que compartía 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos y 85% en la secuencia de nucleótidos con p23 de la cepa 2591. La comparación de las proteínas de las 3 cepas mostró que la secuencia en la región 5' (la mayor parte es la región del péptido líder) y la región 3' se encuentran conservadas, pero hay una alta variabilidad en la región central (Fig. 8).

El análisis de la secuencia de ADN en la región 5' a la región que codifica p23 expuso una falta de 54-pb 5' a las regiones consenso -10 y -35 del promotor. El hallazgo de esta falta de pb en una región tan cercana a la región promotora, sugirió la pérdida en comparación con la cepa 2591 de un elemento potenciador de la transcripción, lo cual resulta en la posible falta de p23 en la cepa B31.

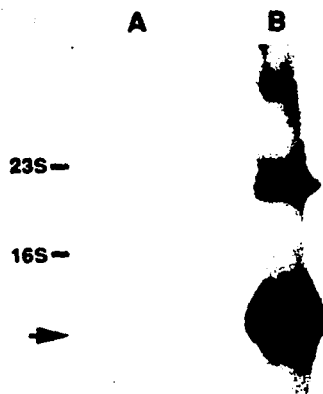


Fig. 13. Análisis por transferencia tipo "Northern" del transcrito de *p23*. El ARN celular total (15 µg por camil) aislado de *B. burgdorferi* B31 (camil A) y *B. burgdorferi* 2591 (camil B) fue fraccionado en un gel desnaturalizante con formaldehído, transferido a una membrana de nylon e hibridado a un oligonucleótido de 17 bases basado en la secuencia de *p23*. La flecha señala dicho transcrito, así mismo, las posiciones 23S y 16S del ARNr están indicadas.

Para confirmar que el gen p23 de B31 codificaba para una proteína funcional y antigénica, fue amplificado usando los mismos iniciadores que para la cepa 2591 y clonado en un vector de expresión y expresado en *E. coli* como una proteína de fusión de la misma manera que p23 de la cepa 2591. Esta p23 recombinante derivada de la cepa B31 fue fuertemente reconocida por los anticuerpos IgM presentes en el suero de un paciente y por los AcM en la misma manera que las formas nativa y recombinante de p23 de la cepa 2591 (datos no mostrados).

**Uso de p23 recombinante en ELISA para la detección de Ac a *B. burgdorferi* en el suero de los pacientes.** Con base en las observaciones de que la reactividad a p23 por anticuerpos de la clase IgM puede ser un marcador serológico significativo en un estado temprano de la enfermedad de Lyme, nosotros consideramos que el uso de p23 recombinante en un ELISA sería una herramienta invaluable en el diagnóstico temprano de la enfermedad y procedimos a probar esta posibilidad. Inicialmente los sueros de 15 pacientes con una alta sospecha clínica de tener la enfermedad de Lyme y con transferencias tipo "Western" para IgM con un mínimo de tres bandas positivas, incluyendo reactividad a p23, fueron probados. Las 15 muestras de estos sueros fueron altamente positivas a la p23 recombinante por ELISA. También fueron incluidos los sueros de 5 pacientes con sífilis, 10 pacientes con altos títulos de factor reumatoide, 5 pacientes infectados con el virus de Epstein-Barr y 10 pacientes con títulos altos de anticuerpos antinucleares, de los cuales todos fueron negativos en este ensayo. Todos estos sueros también fueron negativos cuando fueron analizados en transferencias tipo "Western" usando el sonicado de la cepa 2591.

## DISCUSION

El establecimiento del diagnóstico en un paciente con enfermedad de Lyme continúa basándose en la confirmación serológica de la exposición al agente causal, *Borrelia burgdorferi*, dentro del contexto de los hallazgos clínicos característicos. Pero el reconocimiento de la enfermedad en el estado temprano puede ser difícil, ya que estos pacientes pueden no manifestar el eritema característico o tener solamente síntomas no específicos similares a una infección viral (86). Esta dificultad en el diagnóstico puede verse complicada por el retraso en la emergencia de una respuesta humoral a la espiroqueta, que pueda ser detectada por los métodos serológicos disponibles en la actualidad (86). Estas pruebas, las cuales hasta ahora han mostrado una falta de estandarización, tampoco distinguen la reactividad hacia proteínas específicas de *B. burgdorferi* y proteínas de reacción cruzada hacia otros organismos patógenos (122,123). El retraso en el establecimiento del diagnóstico en esta enfermedad en sus estados tempranos es clínicamente importante, porque el tratamiento apropiado con antibióticos puede prevenir las serias secuelas de esta infección potencialmente crónica (16,124).

En los estudios iniciales llevados a cabo en pacientes de los Estados Unidos que se encontraban en la etapa temprana de la enfermedad, el análisis por transferencia tipo "Western" mostró reactividad IgM predominantemente contra la proteína flagelar de 41-kDa. Sin embargo, la detección de anticuerpos a esta proteína no es específica para la enfermedad de Lyme, ya que su secuencia se encuentra conservada en otras espiroquetas, incluyendo los patógenos orales comunes (124).

En estudios similares llevados a cabo con pacientes en Europa, y utilizando diferentes cepas de *B. burgdorferi* como fuente de antígeno, la reactividad IgM fue detectada más

frecuentemente contra una proteína abundante de 21- a 22-kDa, la cual fue designada pC (125). Esta proteína ha sido observada en aproximadamente 45% de las cepas de *B. burgdorferi* en Europa, pero solo raramente observada en las cepas aisladas en los Estados Unidos (92).

En nuestro laboratorio, nosotros hemos detectado anticuerpos IgM en el suero de pacientes en un estado temprano de la enfermedad de Lyme, que reconocen predominantemente una proteína con una masa molecular de aproximadamente 23-kDa y a la que denominamos p23. En estas pruebas serológicas usamos una cepa aislada en el estado de Connecticut, *B. burgdorferi* 2591, la cual produce esta proteína de manera abundante. Nuestro principal interés ha sido identificar y caracterizar a p23, compararla con la proteína denominada pC encontrada en cepas europeas y, finalmente, expresarla de manera recombinante y utilizarla en ensayos que puedan ser estandarizados para la detección de una respuesta serológica en el estado temprano de la enfermedad.

Después de clonar y secuenciar el gen de p23 de la cepa 2591, nosotros encontramos un marco de lectura con 212 aminoácidos, lo que corresponde a una masa molecular aproximada de 22,250 Da. La comparación de las secuencias de nucleótidos y de los residuos de aminoácidos de p23 con las de pC de la cepa europea PKo (118), mostró un alto grado de homología. Así mismo, como recientemente ha sido reportado para pC, nosotros hemos también localizado p23 sobre la superficie externa de la bacteria por medio de inmunomicroscopía electrónica (126) y, de esta manera, consideramos que p23 y pC son homólogos de la misma proteína de la superficie externa y que ahora ha sido renombrada OspC (126).

Dentro de nuestros estudios, nosotros encontramos también la falta de expresión de esta proteína, OspC, por la cepa B31, una cepa de *B. burgdorferi* que ha sido comúnmente usada

como fuente de antígeno en los ensayos serológicos comercialmente disponibles en el mercado de los Estados Unidos. De esta manera, es importante resaltar que una proteína como *OspC*, que aparentemente es expresada durante una infección, se pierde en algunas cepas en cultivo. Pudiera ser que la función de esta proteína, hasta ahora desconocida, no sea relevante para la sobrevivencia de la bacteria en medios de cultivo. Sin embargo, tampoco se conoce la importancia de esta proteína en el crecimiento de la bacteria *in vivo*. La cepa B31, al igual que la cepa 2591, pertenece al mismo grupo genético, conocido como genespecie I o *B. burgdorferi* sensu stricto, mientras que la cepa PKo, pertenece al grupo VS461 o genespecie III (42,127). Nosotros no pudimos detectar esta proteína en los sonificados de la cepa B31 en PAGE-SDS ni en transferencias tipo "Western", y tampoco sobre la bacteria por microscopía electrónica, usando un anticuerpo monoclonal dirigido en contra de esta proteína. Sin embargo, en este trabajo, estamos confirmando que el gen *ospC* está presente en esta cepa; además, observamos una falta de 54-pb en la región 5' al primer codón de iniciación de la transcripción, localizándose justamente 5' de las regiones consenso -35 y -10 similares al promotor de *E. coli*. El análisis por transferencia tipo "Northern" de B31 mostró un bajo nivel de ARNm de *ospC*, y en los estudios por extensión del iniciador, también observamos que el sitio de inicio de la transcripción se encuentra 1 base más hacia el extremo 5' del encontrado para la cepa 2591. No obstante, recientemente Marconi y cols. (39) han reportado que el inicio de la transcripción de *ospC* puede encontrarse bajo el control de uno o más promotores. Sin embargo, además del promotor funcional encontrado en este estudio, nosotros no detectamos ninguna evidencia de productos de terminación más largos en ninguna de las dos cepas, cuando las películas fotográficas fueron expuestas por un período prolongado de tiempo.



Entre algunas de las causas que han sido propuestas para la variabilidad en la expresión de *OspC*, en estas cepas que han sido mantenidas en cultivo por múltiples generaciones, están: mutaciones, pérdida del plásmido que codifica el gen, así como otros mecanismos aún no definidos que pueden ser sensibles a las condiciones variantes de crecimiento (41,93,126). El hecho de que diferentes cepas de *B. burgdorferi*, así como diferentes clonas de una sola cepa expresen pequeñas cantidades de *OspC*, cuando al mismo tiempo expresan grandes cantidades de *OspA* y viceversa, sugiere una interdependencia en la regulación de la expresión de la proteína, y aunque puede haber un mecanismo que conlleve a la supresión, la regulación de estos genes no ha sido aún esclarecida (126)

Nosotros proponemos que este fragmento de 54-pb faltante contiene un elemento potenciador de la transcripción, requerido para observar un nivel transcripcional aumentado y niveles detectables en la expresión de la proteína. Sin embargo, cualquier evidencia que pueda soportar esta proposición pudiera ser circunstancial, ya que la posible identificación de este elemento regulatorio requiere de la tecnología de transferencia genética, la cual no ha sido llevada a cabo en las especies del género *Borrelia* (93).

Šadziane et al. (40), lo mismo que Marconi et al.(39) localizaron el gen *ospC* en un plásmido circular de 27-kb, pero el primer grupo también encontró que *OspC* fue expresada solo en mutantes que habían perdido el plásmido lineal de 16-kb (lp 16). Esto sucedió tanto en la presencia o ausencia de el plásmido de 49-kb que contiene los genes *ospA* y *ospB*, aunque pudo observarse una mayor expresión cuando este plásmido no estuvo presente. Una de las hipótesis formuladas fue que una proteína o ARN codificada por el lp 16 puede funcionar como un represor de la expresión de *ospC*. Otra observación importante fue que la pérdida de este plásmido, también llevó a la pérdida de la habilidad de las bacterias de crecer en medio sólido. De manera interesante, Wilske et al. encontraron que cepas que no

expresaban OspC, fueron capaces de hacerlo cuando fueron crecidas en medio sólido (126). Es interesante hacer notar, que también es posible que B31, conteniendo todos los plásmidos, pudiera ser capaz de expresar OspC de manera abundante cuando está presente en alguno de sus huéspedes, ya sea mamífero o en la garrapata. Sin embargo, las razones moleculares para estos cambios en los requerimientos de cultivo y como ellos pueden afectar la regulación de la expresión de proteínas no ha sido estudiado.

Finalmente, para determinar si la región de *ospC* de B31 que codifica para la proteína, es capaz de producir una proteína que sea reconocida por los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes, el gen fue clonado también en el vector de expresión para obtener una proteína recombinante en *E. coli*. Los resultados obtenidos mostraron una fuerte reactividad tanto de los sueros de pacientes como de los AcM producidos contra OspCr de la cepa 2591 hacia esta proteína proveniente de B31.

Actualmente, esta proteína recombinante está siendo producida y utilizada en pruebas diagnósticas. Los estudios preliminares han mostrado que OspCr es un antígeno específico y que su utilización en ELISA provee un ensayo sensible y estandarizado en la detección de la enfermedad en estados tempranos. Una consideración para el uso de esta proteína ha sido si la OspCr de la cepa 2591, originalmente aislada en Connecticut, sería un blanco útil para probar muestras de sueros de pacientes que han sido infectados en otras áreas del país. En un estudio reciente (94), todas las muestras obtenidas fueron de pacientes que habían contraído la enfermedad fuera del estado de Connecticut, y a pesar de esto, estas muestras mostraron frecuentemente una fuerte reactividad a la OspCr, sugiriendo que esta proteína es expresada constantemente por las espiroquetas en la naturaleza, está presente en el momento o un poco después de la inoculación y que existen epítopes comunes en OspC que son compartidos por *B. burgdorferi* de diferentes áreas geográficas.

Los futuros estudios de esta proteína están encaminados a su optimización en los ensayos para probar los límites de detección temprana, y debido a la severidad de la enfermedad, así como la falta de respuesta de los pacientes en una fase crónica de la enfermedad, existe interés en su uso para el desarrollo de una vacuna para la prevención de esta enfermedad. Hasta hoy, los esfuerzos se han concentrado en dos proteínas de la superficie externa OspA y OspB (128,129).

El desarrollo de una vacuna para esta enfermedad ha requerido de la identificación de los principales antígenos de la bacteria y la determinación de si estos antígenos son capaces de inducir una respuesta inmune específica en pacientes infectados. OspC es un antígeno predominante reconocido por anticuerpos IgM en la fase temprana de la enfermedad, mientras que sólo un reducido número de pacientes desarrollan una respuesta IgM temprana a OspA y/o OspB. En contraste, en la segunda fase de la enfermedad, los pacientes desarrollan anticuerpos a varios antígenos incluyendo a OspA y OspB, pero no es frecuente que desarrollen anticuerpos IgG dirigidos a OspC. Hasta hoy, no es claro por qué existe este patrón temporal en la respuesta inmune a estas proteínas, pero aunque hay suficientes evidencias que soportan la eficacia de la vacuna basada en OspA/B en ratones (128) y las pruebas en humanos han empezado (130), hay muchas preguntas aún sobre su efectividad y mucha preocupación sobre los efectos secundarios que pudiera causar esta vacuna, lo cual genera la gran necesidad de desarrollar mayores investigaciones con el fin de generar una vacuna adecuada.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

1.- Sigal, L.H. & Curran, A.S. Lyme disease: A multifocal worldwide epidemic. *Annu. Rev. Public Health* 12: 85-109, 1991.

2.- Lyme Disease-United States, 1991-1992 (report cases). *Morbidity and Mortality Weekly Report* 42: 345-348, 1993.

3.- Ciesielski, C.A., Markowitz, L.E., Horsley, R., Hightower, A.W., Rusell, H. & Broome, C.V. The geographic distribution of Lyme disease in the United States. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 539: 283-288, 1988.

4.- Steere, A.C., Malawista, S.E., Snyderman, D.R., Shope, R.E., Andiman, W.A., Ross, M.R. & Steele, F.M. Lyme arthritis: An epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis Rheum.* 20: 7-17, 1977.

5.- Schoen, R.T. Pathogenesis, diagnosis, manifestations and treatment of Lyme disease. *Current Opinion in Rheumatology* 3: 610-616, 1991.

6.- Steere, A.C., Malawista, S.E., Hardin, J.A., Ruddy, S., Askenase, P.W. & Andiman, W.A. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum. *Ann. Intern. Med.* 86: 685-698, 1977.

7.- Afzelius, A. Erythema chronicum migrans. *Acta Derm. Venereol. (Stockh)* 2 : 120-125, 1921.

8.- Lipschütz, B. Weiterer Beitrag zur Kenntnis des "Erythema chronicum migrans". *Arch. Dermatol. Syph.* 143: 365-374, 1923.

9.- Habicht, G.S., Beck, G. & Benach, J.L. Lyme disease. *Scient. Amer.* 257: 78-83, 1987.

10.- Steere, A.C., Broderick, T.F. & Malawista, S.E. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: Epidemiologic evidence for a tick vector. *Am. J. Epidemiol.* 108: 312-321, 1978.

- 11.- Spielman, A., Wilson, M.L., Levine, J.F. & Piesman, J. Ecology of *Ixodes dammini*-borne human babesiosis and Lyme disease. *Annu. Rev. Entomol.* 30: 439-460, 1985.
- 12.- Wallis, R.C., Brown, S.E., Kloter, K.O. & Main, A.J.Jr. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: Field study of ticks. *Am. J. Epidem.* 108: 322-327, 1978.
- 13.- Barbour, A.G. & Fish, D. The biological and social phenomenon of Lyme disease. *Science* 260: 1610-1616, 1993.
- 14.- Hardin, J.A. Lyme disease. *Clin. Aspects of Autoimmun.* 4: 23-29, 1990.
- 15.- Holström, E. Successful treatment of erythema migrans afzelius. *Dermatol. Venereol. (Stockh)* 31: 235-243, 1951.
- 16.- Steere, A.C., Malawista, S.E., Newman, J.H., Spieler, P.N. & Bartenhagen, N.H. Antibiotic therapy in Lyme disease. *Ann. Intern. Med.* 93: 1-8, 1980.
- 17.- Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Benach, J.L., Grunwaldt, E. & Davis, J.P. Lyme disease—a thick-borne spirochetosis? *Science* 216: 1317-1319, 1982.
- 18.- Barbour, A.G. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J. Biol. Med.* 57: 521-525, 1984.
- 19.- Steere, A.C., Grodzicki, R.L., Komblatt, A.N., Craft, J.E., Barbour, A.G., Burgdorfer, W., Schmid, G.P., Johnson, E. & Malawista, S.E. The spirochetal etiology of Lyme disease. *New Engl. J. Med.* 308: 733-740, 1983.
- 20.- Benach, J.L., Bosler, E.M., Hanrahan, J.P., Coleman, J.L., Habicht, G.S., Bast, T.F., Cameron, D.J., Ziegler, J.L., Barbour, A.G., Burgdorfer, W., Edelman, R. & Kaslow, R. A. Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. *New Eng. J. Med.* 308: 740-742, 1983.

- 21.- Schmid, G.P., Steigerwalt, A.G., Johnson, S.E., Barbour, A.G., Steere, A.C., Robinson, I.M. & Brenner, D.J. DNA characterization of the spirochete that causes Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 20: 155-158, 1984.
- 22.- Johnson, R.C., Schmid, G.P., Hyde, F.W., Steigerwalt, A.G. & Brenner, D.J. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: Etiologic agent of Lyme disease. *Intl. J. System. Bacteriol.* 34: 496-497, 1984.
- 23.- Kantor, F.S. Disarming Lyme disease. *Scient. Amer.* 271: 34-39, 1994.
- 24.- Steere, A.C., Bartenhagen, N.H., Craft, J.E., Hutchinson, G.J., Newman, J.H., Rahn, D.W., Sigal, L.H., Spieler, P.H., Stern, K.S. & Malawista, S.E. The early clinical manifestations of Lyme disease. *Ann. Intern. Med.* 99: 76-82, 1983.
- 25.- Paster, B.J., Dewhirst, F.E., Weisburg, W.G., Tordoff, L.A., Frase, G.J., Hespell, R.B., Stanton, T.B., Zablen, L., Mandelco, L. & Woese, C.R. Phylogenetic analysis of the spirochetes. *J. Bacteriol.* 173: 6101-6109, 1991.
- 26.- Schmid, G.P. Epidemiology and clinical similarities of human spirochetal diseases. *Rev. Infec. Dis.* 11: S1460-S1469, 1989.
- 27.- Barbour, A.G. & Hayes, S.F. Biology of *Borrelia* species. *Microbiol. Rev.* 50: 381-400, 1986.
- 28.- Ferdows, M.S. & Barbour A.G. Megabase-sized linear DNA in the bacterium *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5969-5973, 1989.
- 29.- Baril, C., Richaud, C., Baranton, G. & Girons I.S. Linear chromosome of *Borrelia burgdorferi*. *Res. Microbiol.* 140: 507-516, 1989.
- 30.- Casjens, S. & Huang, W.M. Linear chromosomal physical and genetic map of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *Mol. Microbiol.* 8: 967-980, 1993.

- 31.- Old, I.G., Ojaimi, C., Margarita, D., Davidson, B.E. & Saint Girons, I. Genomic conservation between *B. burgdorferi*, *B. garinii* and *B. afzelii*. VI Intl. Conf. on Lyme Borreliosis P020M, Bologna, Italia, 1994 (abstr).
- 32.- Lam, T.T., Nguyen, T-P.K., Fikrig, E. & Flavell, R.A. A chromosomal *Borrelia burgdorferi* gene encodes a 22-kilodalton lipoprotein, p22, that is serologically recognized in Lyme disease. J. Clin. Microbiol. 32: 876-883, 1994.
- 33.- Simpson, W.J., Cieplak, W., Schrumph, M.E., Barbour, A.G. & Schwan, T.G. Nucleotide sequence and analysis of the gene in *Borrelia burgdorferi* encoding the immunogenic P39 antigen. FEMS Microbiol. Lett. 119: 381-387, 1994.
- 34.- Lefebvre, R.B., Perng, G-C. & Johnson, R.C. The 83-kilodalton antigen of *Borrelia burgdorferi* wich stimulates immunoglobulin M (IgM) and IgG responses in infected hosts is expressed by a chromosomal gene. J. Clin. Microbiol. 28: 1673-1675, 1990.
- 35.- Bergström, S., Bunikis, J., Jonsson, M. & Noppa, L. Expression of Lyme disease *Borrelia* genes. VI Intl. Conf. on Lyme Borreliosis O008M, Bologna, Italia, 1994 (abstr).
- 36.- Rosa, P. & Margolis, N. Unique plasmid location and linkage of genes encoding purine biosynthesis enzymes and outer surface protein C in *Borrelia burgdorferi*. VI Intl. Conf. on Lyme Borreliosis I001M, Bologna, Italia, 1994 (abstr).
- 37.- Barbour, A.G. & Garon, C.F. Linear plasmids of the bacterium *Borrelia burgdorferi* have covalently closed ends. Science 237: 409-411, 1987.
- 38.- Lam, T.T., Nguyen, T.P., Montgomery, R.R., Kantor, F.S., Fikrig, E. & Flavell, R.A. Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. Infec. Immun. 62: 290-298, 1994.
- 39.- Marconi, R.T., Samuels, D.S. & Garon, C.F. Transcriptional analyses of the *ospC* gene in Lyme disease. J. Bacteriol. 175: 926-932, 1993.

40.- Šadziene, A., Wilske, B., Ferdows, M.S. & Barbour, A.G. The cryptic *ospC* gene of *Borrelia burgdorferi* B31 is located on a circular plasmid. *Infect. Immun.* 61:2192-2195, 1993.

41.- Norris, S.J., Carter, C.J., Howell, J.K. & Barbour, A.G. Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: Characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein. *Infect. Immun.* 60: 4662-4672, 1992.

42.- Baranton, G., Postic, D., Girons, I.S., Boerlin, P., Piffaretti, J-C., Assous, M. & Grimont, P.A.D. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int. J. System. Bacteriol.* 42: 378-383, 1992.

43.- Steere, A.C., Hardin, J.A. & Malawista, S.E. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: Cryoimmunoglobulins and clinical activity of skin and joints. *Science* 196: 1121-1122, 1977.

44.- Steere, A.C., Hardin, J.A., Ruddy, S. Lyme arthritis: Correlation of serum and cryoglobulin IgM with activity, and serum IgG with remission. *Arthritis Rheum.* 22: 471-473, 1979.

45.- Hardin, J.A., Walker, L.C., Steere, A.C., Trumble, T.C., Tung, K.S.K., Williams, R.C., Ruddy, S. & Malawista, S.E. Circulating immune complexes in Lyme arthritis: Detection by the <sup>125</sup>I-C1q binding, C1q solid phase, and Raji cell assays. *J. Clin. Invest.* 63: 468-477, 1979.

46.- Szczepanski, A. & Benach, J.L. Lyme borreliosis: Host responses to *Borrelia burgdorferi*. *Microbiol. Rev.* 55: 21-34, 1991.

47.- Duray, P.H. & Steere, A.C. Clinical pathologic correlations of Lyme disease by stage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 539: 378-379, 1988.

48.- Schmidli, J., Hunziker, T., Moesli, P. & Schaad, U.B. Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from joint fluid three months after treatment of facial palsy due to Lyme borreliosis. *J. Infect. Dis.* 158: 905-906, 1988.



- 49.- Kochi, S.K. & Johnson R. C. Role of immunoglobulin G in killing of *Borrelia burgdorferi* by the classical complement pathway. *Infect. Immun.* 56: 314-321, 1988.
- 50.- Benach, J.L., Coleman, J.L., Garcia-Monco, J.C. & DePonte, P.C. Biological activity of *Borrelia burgdorferi* antigens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 539: 115-125, 1988.
- 51.- Hardin, J.A., Steere, A.C. & Malawista, S.E. Immune complexes and the evolution of Lyme arthritis. *N. Eng. J. Med.* 301: 1358-1363, 1979.
- 52.- Benach, J.L., Fleit, H.B., Habicht, G.S., Coleman, J.L., Bosler, E. & Lane, B.P. Interactions of phagocytes with the Lyme disease spirochete: role of the Fc receptor. *J. Infect. Dis.* 150: 497-507, 1984.
- 53.- Montgomery, R.R., Nathanson, M.H., & Malawista, S.E. Fc- and non-Fc-mediated phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* by macrophages. *J. Infect. Dis.* 170: 890-893, 1994.
- 54.- Banfi, E., Cinco, M., Particari, S., & Presani, G. Rapid flow cytometric studies of *Borrelia burgdorferi* phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *J. Appl. Bacteriol.* 67: 37-45, 1989.
- 55.- Benach, J.L., Habicht, G.S., Gocinski, B.L. & Coleman, J.L. Phagocytic cell responses to *in vivo* and *in vitro* exposure to the Lyme disease spirochete. *Yale J. Biol. Med.* 57: 599-605, 1984.
- 56.- Peterson, P.K., Clawson, C.C., Lee, D.A., Garlich, D.J., Quie, P.G. & Johnson, R.C. Human phagocyte interaction with the Lyme disease spirochete. *Infect. Immun.* 48: 608-611, 1984.
- 57.- Szczepanski, A. & Fleit, H.B. Interaction between *Borrelia burgdorferi* and polymorphonuclear leukocytes. Phagocytosis and the induction of the respiratory burst. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 539: 425-428, 1988.

58.- Rittig, M.G., Krause, A., Häupl, T., Schaible, U.E., Modolell, M., Kramer, M.D., Lütjen-Drecoll, E., Simon, M.M. & Burmester, G.R. Coiling phagocytosis is the preferential phagocytic mechanism for *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 60: 4205-4212, 1992.

59.- Rittig, M.G., Häupl, T., Krause, A., Kressel, M., Groscurth, P. & Burmester, G.R. *Borrelia burgdorferi*-induced ultrastructural alterations in human phagocytes: A clue to pathogenicity? *J. Path.* 173: 269-282, 1994.

60.- Montgomery, R.R., Nathanson, M.H. & Malawista, S.E. The fate of *Borrelia burgdorferi*, the agent for Lyme disease, in mouse macrophages. *J. Immunol.* 150: 909-915, 1993.

61.- Habicht, G.S., Beck, G., Benach, J.L., Coleman, J.L. & Leightling, K.D. Lyme disease spirochete induce human and murine IL-1 production. *J. Immunol.* 134: 3147-3154, 1985.

62.- Habicht, G.S., Beck, G. & Benach, J.L. The role of IL-1 in the pathogenesis of Lyme disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 539: 103-111, 1988.

63.- Beck, G., Benach, J.L. & Habicht, G.S. Isolation of interleukin-1 from joint fluids of patients with Lyme disease. *J. Rheumatol.* 16: 800-806, 1989.

64.- Beck, G., Habicht, G.S., Benach, J.L. & Coleman, J.L. Chemical and biological characterization of a lipopolysaccharide from the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*). *J. Infect. Dis.* 152: 108-117, 1985.

65.- Takayama, K., Rothenberg, R.J. & Barbour, A.G. Absence of lipopolysaccharide in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 55: 2311-2313, 1987.

66.- Cinco, M., Banfi, E., Balanzin, D., Godeas, C. & Panfilini, E. Evidence for (lipo)oligosaccharides in *Borrelia burgdorferi* and their serological specificity. *FEMS Microbiol. Immun.* 3: 33-38, 1991.

- 67.- Beck, G. & Habicht, G.S. Isolation and biological activity of *Borrelia burgdorferi* peptidoglycan. Ann. N. Y. Acad. Sci. 539: 365-366, 1988.
- 68.- Steere, A.C., Brinkerhoff, C.E., Miller, D.J., Drinker, H., Harris, E.D. & Malawista, S.E. Elevated levels of collagenase and prostaglandin E<sub>2</sub> from synovium associated with erosion of cartilage and bone in a patient with chronic Lyme arthritis. Arthritis Rheum. 23: 591-599, 1980.
- 69.- Craft, J.E., Fisher, D.K., Shimamoto, G.T. & Steere, A.C. Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme disease: Appearance of a new immunoglobulin M response and expansion of the immunoglobulin G response late in the illness. J. Clin. Invest. 78: 934-939, 1986.
- 70.- Dattwyler R.J., Volkman D.J. & Luft, B.J. Immunologic aspects of Lyme borreliosis. Rev. Infec. Dis. 11: S1494-S1498, 1989.
- 71.- Sigal, L.H., Steere, A.C. & Dwyer, J.M. *In vivo* and *in vitro* evidence of B cell hyperactivity during Lyme disease. J. Rheumatol. 15: 648-654, 1988.
- 72.- Dattwyler, R.J., Thomas, J.A., Benach, J.L. & Golightly, M.G. Cellular immune response in Lyme disease: The response to mitogens, live *Borrelia burgdorferi*, NK cell function and lymphocyte subsets. Zbl. Bakt. Hyg. A263: 151-159, 1986.
- 73.- Sigal, L.H., Steere, A.C., Freeman, D.H. & Dwyer, J.M. Proliferative responses of mononuclear cells in Lyme disease. Arthritis Rheum. 29: 761-769, 1986.
- 74.- Zoschke, D.C., Skemp, A.A. & Defosse, D.L. Lymphoproliferative responses to *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease. Ann. Inter. Med. 114: 285-289, 1991.
- 75.- Roessner, K., Fikrig, E., Russell, J.Q., Cooper, S.M., Flavell, R.A. & Budd, R.C. Prominent T lymphocyte response to *Borrelia burgdorferi* from peripheral blood of unexposed donors. Eur. J. Immunol. 24: 320-324, 1994.

76.- Steere, A.C. Pathogenesis of Lyme Arthritis, implications for rheumatic disease. Ann. N. Y. Acad. Sci. 539: 87-92, 1988.

77.- Krause, A., Brade, V., Schoemer, C., Solbach, W., Kalden, J.R. & Burmester, G.R. T cell proliferation induced by *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme borreliosis. Autologous serum required for optimum stimulation. Arthritis Rheum. 34: 393-402, 1991.

78.- Schlesier, M., Haas, G., Wolff-Vorbeck, G., Melchers, I. & Peter, H-H. Autoreactive T cells in rheumatic disease (1) Analysis of growth frequencies and autoreactivity of T cells in patients with rheumatoid arthritis and Lyme disease. J. Autoimmun. 2: 31-49, 1989.

79.- Yssel, H., Nakamoto, T., Schneider, P., Freitas, V., Collins, C., Webb, D., Mensi, N., Soderberg, C. & Peltz, G. Analysis of T lymphocytes cloned from the synovial fluid and blood of a patient with Lyme arthritis. Intl. Immunol. 2: 1081-1089, 1990.

80.- Lahesmaa, R., Shanafelt, M-C., Allsup, A., Soderberg, C., Anzola, J., Freitas, V., Turck, C., Steinman, L. & Peltz, G. Preferential usage of T cell antigen receptor V region gene segment V $\beta$  5.1 by *Borrelia burgdorferi* antigen-reactive T cell clones isolated from a patient with Lyme disease. J. Immunol. 150: 4125-4135, 1993.

81.- Yoshinari, N.H., Reinhardt, B.N. & Steere, A.C. T cell responses to polypeptide fractions of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme arthritis. Arthritis Rheum. 34: 707-713, 1991.

82.- Krause, A., Burmester, G.R., Rensing, A., Schoemer, C., Schaible, U.E., Simon, M.M., Herzer, P., Kramer, M.D. & Wallich, R. Cellular immune reactivity to recombinant OspA and flagellin from *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme borreliosis. J. Clin. Invest. 90: 1077-1084, 1992.

83.- Barbour, A.G. Laboratory aspects of Lyme borreliosis. Clin. Microbiol. Rev. 1: 399-414, 1988.

- 84.- Steere, A.C., Hutchinson, G.J., Rahn, D.W., Sigal, L.H., Craft, J.E. DeSanna, E.T. & Malawista, S.E. Treatment of the early manifestations of Lyme disease. *Ann. Inter. Med.* 99: 22-26, 1983.
- 85.- Steere, A.C., Grodzicki, R.L., Craft, J.E., Shrestha, M., Komblatt, A.N. & Malawista, S.E. Recovery of Lyme spirochetes from patients. *Yale J. Biol. Med.* 57: 557-560, 1984.
- 86.- Steere, A.C. Medical Progress: Lyme disease. *N. Eng. J. Med.* 321: 586-596, 1989.
- 87.- Craft, J.E., Grodzicki, R.L. & Steere, A.C. Antibody response in Lyme disease: Evaluation of diagnostic tests. *J. Infect. Dis.* 149: 789-795, 1984.
- 88.- Hansen, K., Hindersson, P. & Strandberg, P.N. Measurement of antibodies to the *Borrelia burgdorferi* flagellum improves serodiagnosis in Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 26: 338-346, 1988.
- 89.- Craft, J.E., Fischer, D.K., Shimamoto, G.T. & Steere, A.C. Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme disease: Appearance of a new immunoglobulin M response and expansion of the immunoglobulin G response late in the illness. *J. Clin. Invest.* 78: 934-939, 1986.
- 90.- Coleman, J.L. & Benach, J.L. Isolation of antigenic components from the Lyme disease spirochete: Their role in early diagnosis. *J. Infect. Dis.* 155: 756-765, 1987.
- 91.- Wilske, B., Preac-Mursic, V., Schierz, G. & Busch, V. Immunochemical and immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains. *Zbl. Bakt. Hyg. A263*: 92-102, 1986.
- 92.- Wilske, B., Preac-Mursic, V., Schierz, G., Liegl, G. & Gueye, W. Detection of IgM and IgG antibodies to *Borrelia burgdorferi* using different strains as antigen. *Zbl. Bakt. Suppl.* 18: 299-309, 1989.

93.- Padula, S.J., Sampieri, A., Dias, F., Szczepanski, A. & Ryan, R. W. Molecular characterization and expression of p23 (OspC) from a North American strain of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 61: 5097-5105, 1993.

94.- Padula, S.J., Dias, F., Sampieri, A., Craven, R. & Ryan, R.W. Use of recombinant OspC from *Borrelia burgdorferi* for serodiagnosis of early Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1733-1738, 1994.

95.- Rahn, D.W. Lyme disease: Clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Sem. Arthritis Rheum.* 20: 201-218, 1991.

96.- Hedberg, C.W., Osterholm, M.T., MacDonald, K.L. & White, K.E. An interlaboratory study of antibody to *Borrelia burgdorferi*. *J. Infect. Dis.* 155: 1325-1327, 1987.

97.- Luger, S.W. & Krauss, E. Serological tests for Lyme disease: Interlaboratory variability. *Arch. Inter. Med.* 150: 761-763, 1990.

98.- Schwartz, B.S., Goldstein, M.D., Ribeiro, J.M.C., Schulze, T.L. & Shahied, S.I. Antibody testing in Lyme disease: A comparison of results in four laboratories. *JAMA* 262: 3431-3434, 1989.

99.- Bakken, L.L., Case, K.L., Callister, S.M., Bourdeau, N.J. & Schell, R.F. Performance of 45 laboratories participating in a proficiency testing program for Lyme disease serology. *JAMA* 268: 891-895, 1992.

100.- Novac, V. Chronic Lyme borreliosis: A case report with sequential urinary antigen measurements. IV Intl. Conf. on Lyme Borreliosis 107, Estocolmo, Suecia, 1990 (abstr).

101.- Hyde, F.W., Johnson, R.C., White, T.J. & Shelburne, C.E. Detection of antigens in urine of humans infected with *Borrelia burgdorferi*, etiologic agent of Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 27: 58-61, 1989.

102.- Rosa, P.A. & Schwan, T.G. A specific and sensitive assay for the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* 160: 1018-1029, 1989.

103.- Persing, D.H. Telford III, S.R., Spielman, A. & Barthold, S.W. Detection of *Borrelia burgdorferi* infection in *Ixodes dammini* ticks with the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 28: 566-572, 1990.

104.- Lebech, A-M.K. *Borrelia burgdorferi*: Studies on taxonomic classification and diagnostic detection of the spirochete in biological specimens. *Dan. Med. Bull.* 41: 456, 1994.

105.- Anderson, J.F., Magnarelli, L.A. & McAninch, J.B. New *Borrelia burgdorferi* antigenic variant isolated from *Ixodes dammini* from upstate New York. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2209-2212, 1988.

106.- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.

107.- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.

108.- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354, 1979.

109.- Ozols, J. Covalent structure of liver microsomal flavin-containing monooxygenase form 1. *J. Biol. Chem.* 265: 10289-10299, 1990.

110.- Ozols, J., Heinemann, F.S. & Gerard, D. High pressure liquid chromatography of polar and hydrophobic peptides of cytochromes from microsomal membranes, p. 417-419. In

C. Birr (ed), *Methods in peptide and protein sequence analysis*. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1980.

111.- Southern, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517, 1975.

112.- Sanger, F., Nicken, S. & Coulson, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467, 1977.

113.- Summers, W.C. A simple method for extraction of RNA from *E. coli* utilizing diethyl pyrocarbonate. *Anal. Biochem.* 33: 459-463, 1970.

114.- Jones, K.A., Yamamoto, R. & Tijan, R. Two distinct transcription factors bind to the HSV thymidine kinase promoter *in vitro*. *Cell* 42: 559-572, 1985.

115.- McKnight, S.L. & Kingsbury, R. Transcription control of a eukaryotic protein-coding gene. *Science* 217: 316-324, 1982.

116.- de St. Groth, S.F. & Scheidegger, D. Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics. *J. Immunol. Methods* 35: 1-21, 1980.

117.- Matsudaira, P. Sequence from picomole quantities of protein electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* 262: 10035-10038, 1987.

118.- Fuchs, R., Jauris, S., Lottspeich, F., Preac-Mursic, V., Wilske, B. & Soutschek, E. Molecular analysis and expression of a *Borrelia burgdorferi* gene encoding a 22 KDa protein (pC) in *Escherichia coli*. *Molec. Microbiol.* 6: 503-509, 1992.

119.- McClure, W.R. Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 54: 171-204, 1985.

120.- Gold, L., Pribnow, D., Schneider, T., Shinedling, S., Singer, B.S. & Stormo, G. Translation initiation in prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* 35: 365-403, 1981.



121.- Bassford, P.J.Jr., Silhavy, T.J. & Beckwith, J.R. Use of gene fusion to study secretion of maltose-binding protein into *Escherichia coli* periplasm. *J. Bacteriol.* 139: 19-31, 1979.

122.- Hansen, K., Bangsberg, J.M., Fjordvang, H., Pedersen, N.S. & Hindersson, P. Immunochemical characterization of and isolation of the gene for a *Borrelia burgdorferi* immunodominant 60-kilodalton antigen common to a wide range of bacteria. *Infect. Immun.* 56: 2047-2053, 1988.

123.- Magnarelli, L.A., Miller, J.N., Anderson, J.A. & Riviere, G.R. Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. *J. Infect.* 156: 183-188, 1987.

124.- Dattwyler, R.J., Volkman, D.J., Conaty, S.M., Platkin, S.P. & Luft, B.J. Amoxicillin plus probenecid versus doxycycline for treatment of erythema migrans borreliosis. *Lancet* 336: 1404-1406, 1990.

125.- Wilske, B., Preac-Mursic, V., Schierz, G., Kuhbeck, R., Barbour, A.G. & Kramer, M. Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 539: 126-143, 1988.

126.- Wilske, B., Preac-Mursic, V., Jauris, S., Hofmann, A., Pradel, I., Soutschek, E., Schwab, E., Will, G. & Wanner, G. Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 61: 2182-2191, 1993.

127.- Wilske, B., Preac-Mursic, V., Gobel, U.B., Graf, B., Jauris, S., Soutschek, E., Schwab, E. & Zumstein. An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31: 340-350, 1993.

128.- Fikrig, E., Barthold, S.W., Kantor, F.S. & Flavell, R.A. Protection of mice against the Lyme disease agent by immunizing with recombinant OspA. *Science* 250: 553-556, 1990.

129.- Fikrig, E., Barthold, S.W., Marcantonio, N., Deponete, K., Kantor, F.S. & Flavell, R.A. Roles of OpA, OspB and flagellin in protective immunity to Lyme borreliosis in laboratory mice. *Infect. Immun.* 60: 657-661, 1992.

130.- Keller, D., Koster, F.T., Marks, D.H., Hosbach, P., Erdile, L.F. & Mays, J.P. Safety and immunogenicity of a recombinant outer surface protein A Lyme vaccine. *JAMA* 271: 1764-1768, 1994.

## Molecular Characterization and Expression of p23 (OspC) from a North American Strain of *Borrelia burgdorferi*

STEVEN J. PADULA,\* ALICIA SAMPIERI,<sup>1</sup> FELICIANO DIAS,<sup>2</sup> ANDREW SZCZEPANSKI,<sup>1</sup> AND RAYMOND W. RYAN<sup>2</sup>

Department of Medicine,<sup>1</sup> Department of Laboratory Medicine,<sup>2</sup> and Central Electron Microscope Facility,<sup>3</sup> University of Connecticut Health Center, 263 Farmington Avenue, Farmington, Connecticut 06030-1310

Received 24 June 1993/Returned for modification 23 August 1993/Accepted 26 September 1993

We have found that sera from patients with early stages of Lyme disease contain predominant immunoglobulin M reactivity to a major 23-kDa protein (p23) from *Borrelia burgdorferi* 2591 isolated in Connecticut. To characterize this immunodominant antigen, we cloned and sequenced p23 and found it to be 83% identical by nucleotide sequence and 75% identical by amino acid sequence to pC (recently renamed OspC), an abundantly expressed protein on the outer surface of PKo, a European strain of *B. burgdorferi* (B. Wilske, V. Preac-Mursic, S. Jauris, A. Hofmann, I. Pradel, E. Soutschek, E. Schwab, G. Will, and G. Wanner, *Infect. Immun.* 61:2182-2191, 1993). In addition, immunoelectron microscopy localized p23 to the outer membrane, confirming that p23 is the strain 2591 homolog of OspC. The North American strain B31, commonly used in serologic assays for Lyme disease, does not express OspC. Northern (RNA) blot analysis detected low levels of *ospC* mRNA in B31, and DNA sequencing of the *ospC* gene from B31 revealed a 54-bp deletion in the upstream regulatory region, possibly accounting for the low transcriptional activity of *ospC*. The *ospC* coding region from B31 was cloned and antibody-reactive OspC was expressed in *Escherichia coli*. An immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant OspC as the target antigen shows promise for the serodiagnosis of early stages of Lyme disease.

Lyme disease is a multisystem infection caused by the tick-borne spirochete, *Borrelia burgdorferi* (25). Because of the low yield by both culture and direct visualization techniques for identification of this organism, the diagnosis of Lyme disease has relied on serologic confirmation in patients with characteristic clinical findings. Accurate serodiagnosis, however, has been complicated by a delayed humoral response to the spirochete and by cross-reactions with proteins from other bacteria (13, 16). Arriving at a timely and accurate diagnosis of Lyme disease is clinically important as prompt and appropriate antibiotic treatment can prevent the potentially serious sequelae that affect the central nervous and musculoskeletal systems (7, 26).

In North America, immunoblot studies of sera from patients with early stages of the disease suggested that the first detectable humoral response to *B. burgdorferi* is an immunoglobulin M (IgM) antibody restricted primarily to the 41-kDa flagellar antigen (3, 6). Similar studies in Europe, however, have reported antibodies in sera during early stages of the disease to be predominantly directed to an approximately 20-kDa protein, which was named pC (very recently pC has been renamed outer surface protein C [OspC] to denote its expression on the outer membrane of the spirochete [30]).

At our institution we have found predominant IgM reactivity to a protein with a size of approximately 23 kDa, which we named p23, in sera which tested positive by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for IgM reactivity to *B. burgdorferi* (9). For both the immunoblot and ELISA, we used *B. burgdorferi* 2591, an isolate which expresses a major protein at approximately 23 kDa, as the source of antigen.

We now report the molecular characterization of p23 and show that it is the strain 2591 homolog of pC (OspC). We

also describe a molecular defect in *B. burgdorferi* B31, a commonly distributed isolate used in North America for serodiagnosis, which may explain its lack of OspC expression and the generally unappreciated reactivity of sera from patients with early stages of Lyme disease with OspC in North America. We also report the use of recombinant OspC for the serodiagnosis of Lyme disease.

### MATERIALS AND METHODS

**B. burgdorferi** strains and antigen preparation. *B. burgdorferi* 2591 was obtained from L. Magnarelli, Department of Entomology, The Connecticut Agricultural Experiment Station, New Haven, Conn. It was initially isolated from a white-footed mouse caught in East Haddam, Conn.; *B. burgdorferi* B31 (type strain) was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, Md.) (ATCC 35210). The spirochetes were grown in BSK II medium in a closed flask at 37°C as previously described (2). After 10 to 14 days of growth, the organisms were washed three times in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) (GIBCO, Grand Island, N.Y.) and sonicated on ice by a cell disruptor (model 185; Branson, Danbury, Conn.) with 10 15-s blasts at 60% of maximum power. The sonicate was cleared by centrifugation at 10,000 × g and 4°C for 20 min. The protein concentration in the supernatant was determined by the Bradford method (5).

**Genomic DNA isolation.** Washed spirochetes were suspended in SET buffer (25% sucrose, 50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 5 mM Na<sub>2</sub>EDTA) and lysed by adding sodium dodecyl sulfate (SDS, final concentration of 0.5%)–RNase A (0.1 mg/ml)–proteinase K (0.1 mg/ml) for 45 min at 37°C with gentle agitation. The DNA was extracted two times with buffered phenol and one time with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) and ethanol precipitated.

**PAGE and electrophoresis.** The *B. burgdorferi* sonicate (40

\* Corresponding author.

to 80 µg per well (0.8-mm thickness and 80-mm width) was mixed with an equal volume of sample buffer (0.125 M Tris-HCl [pH 6.8], 4% SDS, 20% glycerol, 2% 2-mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue), boiled for 5 min, and subjected to polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in a discontinuous 0.1% SDS–12% polyacrylamide slab gel with buffers described by Laemmli (15). Molecular mass standards included myosin (200,000 Da), *Escherichia coli* β-galactosidase (116,250 Da), rabbit muscle phosphorylase *b* (97,400 Da), bovine serum albumin (BSA; 66,200 Da), hen egg white ovalbumin (45,000 Da), bovine carbonic anhydrase (29,000 Da), soybean trypsin inhibitor (21,500 Da), and hen egg white lysozyme (14,400 Da). The gels were stained and fixed with 0.25% Coomassie brilliant blue R in 50% methanol–10% acetic acid and destained with 40% methanol–10% acetic acid. For the preparative gel, 250 to 825 µg of protein was added to a well (1.5 mm by 140 mm). The band corresponding to p23 was visualized by precipitation with cold 0.1 M KCl and was cut from the remainder of the gel. The protein was isolated by electroelution and dialyzed successively against 0.02 M ammonium bicarbonate–0.1% SDS for 12 h and 0.1 M ammonium bicarbonate–0.02% SDS for 12 h. The protein concentration was determined by the bicinchoninic acid protein assay (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.).

**Immunoblot analysis.** Proteins separated by SDS-PAGE were transferred to nitrocellulose and incubated with sera or supernatants containing monoclonal antibody (MAb) by a modification of the method described by Towbin et al. (28). Transfer of the proteins to nitrocellulose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.) was done in a Trans-Blot cell (Bio-Rad Laboratories) containing 192 mM glycine, 25 mM Tris base, and 20% methanol at 0.5 A for 1 h with cooling. The transferred proteins were visualized by staining the nitrocellulose membrane with 0.5% Ponceau S in 1% glacial acetic acid. Nonspecific binding to the blots was blocked by incubation for 1 h at 20°C in TBS (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl) with 1% BSA. The blots were washed three times with TBST (TBS with 0.05% Tween-20) and then incubated with patient's sera (1:100 in TBS–1% BSA) or hybridoma supernatant (1:5 in TBS–1% BSA) for 1 h at 20°C. After the blots were washed four times with TBST, they were incubated with goat anti-mouse IgM and IgG (heavy and light chains) conjugated to alkaline phosphatase (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, Md.) or goat anti-human γ chain and anti-human μ chain conjugated to peroxidase (Sigma, St. Louis, Mo.). The blots were then washed four times with TBST, and substrate (nitroblue tetrazolium-BCIP [5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate toluidinium]) for the alkaline phosphatase conjugate or 3,3'-diaminobenzidine-hydrogen peroxide for the peroxidase conjugate) was added.

**Partial amino acid sequence determination of p23.** Trypsin digestion was performed as previously described (22). Briefly, the electroeluted protein was lyophilized, resuspended in 20% trichloroacetic acid, and precipitated at 4°C for 12 h. After centrifugation, the pellet was resuspended in 0.5 ml of cold 0.2% HCl in acetone and incubated at –20°C for several days. After two washes with cold acetone, the protein (approximately 25 µg) was dried at 20°C and digested with 0.25 nmol of trypsin (Worthington, Freehold, N.J.) in 2.3 M urea–0.1 M Tris-HCl [pH 8.06]–0.2 M ammonium bicarbonate for a maximum of 24 h at 20°C. The peptide mixture was resolved by reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) (23). The sequence analysis of the peptides was carried out on an Applied Biosystems

model 470A gas-phase sequencer equipped with a model 120A PTH analyzer according to instructions from the manufacturer.

**Isolation of the gene encoding p23.** Degenerate oligonucleotide primers were synthesized on the basis of the amino acid sequence of two trypsin-digested peptide fragments. The polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify the intervening segment of DNA between the two primers: upstream primer, 5'-GT(AT)AAG GAG GT(AT) GA(AG) AC-3' and downstream primer, 5'-CC GTT (TC)TG (AG)TT (GATC)GC (GATC)CC-3'. Amplification was performed in a volume of 100 µl in a thermal controller (MJ Research, Watertown, Mass.) under the following conditions: 94°C for 5 min, 40°C for 1 min, 72°C for 1 min, 94°C for 1 min, 39°C for 1 min, 72°C for 1 min; 94°C for 1 min, 38°C for 1 min, 72°C for 1 min for 30 cycles; and 72°C for 5 min for extension. Each primer was used at a final concentration of 0.5 µM, and 50 ng of genomic DNA was used as the template. The amplification buffer included 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4) (at 25°C), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg of BSA per ml, 0.125 nM (each) deoxynucleoside triphosphate, and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase. The amplified DNA was radiolabeled by the random primer technique and used to probe a Southern blot of genomic *B. burgdorferi* DNA separately restricted with eight different restriction enzymes. Genomic DNA was cut with the appropriate restriction enzyme, and fragments with corresponding sizes were isolated from low-melt agarose and cloned into pBS (Stratagene, La Jolla, Calif.) and transformed into DH5α (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.). The radiolabeled PCR-amplified fragment was used to probe the selected library by colony hybridization, and positive colonies were grown. The cloned insert was sequenced in both orientations by dideoxy chain termination with Sequenase version 2.0 (U.S. Biochemicals, Cleveland, Ohio).

**Northern (RNA) blot analysis and transcriptional start site.** Total cellular RNA was obtained from the spirochetes in the presence of diethylpyrocarbonate as previously described (27). RNA (15 µg per lane) was electrophoresed in a 0.66 M formaldehyde-MOPS (morpholinepropanesulfonic acid)–1% agarose denaturing gel, transferred to a nylon membrane (Nytran; Schleicher & Schuell, Keene, N.H.), and hybridized to a synthetic 17-mer oligonucleotide (5'-CTTCCCT GAATTATTA-3'), complementary to a sequence which is identical in strains 2591 and B31. The oligonucleotide was 3' labeled with digoxigenin, and prehybridization and hybridization were performed at 42°C as recommended by the manufacturer (Genius System; Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, Ind.). The membrane was washed in 6× SSC (1× SSC is 0.15 M NaCl and 0.015 M sodium citrate)–0.05% PP, twice at 20°C for 5 min and twice at 42°C for 15 min. Immunodetection of the oligonucleotide with an alkaline phosphatase-conjugated antidigoxigenin antibody and visualization by chemiluminescence were performed according to the manufacturer's recommendations.

The transcriptional start site for the p23 gene was determined by primer extension analysis as previously described (14, 21). The 17-mer primer used in the Northern blot analysis was 5' labeled with [<sup>32</sup>P]ATP (Amersham, Arlington Heights, Ill.) and T4 polynucleotide kinase (Bethesda Research Laboratories) and separated from unincorporated label with a G25 spin column (Select-D; 5Prime–3Prime, Boulder, Colo.). Three pmoles of the labeled primer was mixed with 15 µg of RNA in 3 µl of hybridization buffer (100 mM KCl, 50 mM Tris-HCl [pH 8.3]), heated to 90°C for 5 min, annealed at 42°C for 10 min, and placed on ice for 15

min. One microliter of 5× reverse transcriptase buffer (250 mM Tris-HCl [pH 8.3], 200 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dithiothreitol, 1 mM (each) deoxynucleoside triphosphate) and 1 μl of RNase H<sup>-</sup> reverse transcriptase (Superscript; Bethesda Research Laboratories) were added to the annealed reaction and incubated at 42°C for 1 h. Five microliters of stop solution (95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol FF) was added, and half of the volume was loaded onto a 6% polyacrylamide sequencing gel. The sizes of the extended products were determined by comparison with a DNA sequencing ladder obtained with the 17-mer oligonucleotide primer and a plasmid containing the *p23* gene.

**Expression of p23 as a fusion protein.** Genomic DNA was used as template for PCR amplification of p23 with primers based on the sequenced DNA. The product was cloned into the *Sma*I site of the expression vector pGEX-2T (Pharmacia-LKB, Piscataway, N.J.) for expression as a fusion protein with glutathione *S*-transferase at the amino terminus to facilitate affinity purification. The cloned gene was sequenced to confirm that it had been inserted in the appropriate reading frame. Colonies were grown overnight in 2 ml of superbroth (32 g of tryptone, 20 g of yeast extract, 5 g of NaCl, 5 ml of NaOH per liter), on the next day isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG; Sigma) was added to 0.1 mM, and the culture was grown for an additional 2 h. The cells were pelleted, resuspended in cold DPBS, and sonicated. The supernatant was cleared by centrifugation, and 50 μl of 50% (wt/vol) glutathione-agarose beads (Sigma) was added to the supernatant and mixed gently at 20°C for 10 min. The beads were washed three times with DPBS, resuspended in SDS-PAGE sample loading buffer, and run in an SDS-12% PAGE.

**Use of recombinant p23 in an ELISA.** Large-scale preparation of the p23 fusion protein was performed as described above, with the additional step of elution of the protein from the beads with 5 mM reduced glutathione (Sigma) in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0). Sixty microliters of the fusion protein (5 μg/ml) in DPBS was added to alternate wells of a flat-bottom microdilution plate (Nunc-Immunoplate; Marsh Biomedical Products, Rochester, N.Y.) for 12 h at 4°C. An equimolar amount of the carrier protein in DPBS was added as a control antigen to the remaining wells. The plates were blocked for 1 h at 37°C with 200 μl of DPBS containing 0.05% horse serum and 0.01% dextran sulfate. The plates were washed six times with DPBS with 0.05% Tween-20 (DPBST). Patients' sera were serially diluted twofold from 1:20 to 1:1,280 in DPBST. Positive and negative control sera were included on each plate. After the addition of sera, the plates were incubated for 1 h at 37°C and then washed six times in DPBST. The secondary antibody used was goat anti-human IgM (μ chain specific) conjugated to peroxidase (Sigma) diluted in DPBST. For screening the hybridoma supernatants for MAb's the secondary antibody used was goat F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse IgG and IgM conjugated to peroxidase (Tago, Burlingame, Calif.). Sixty microliters of chromogen substrate [equal volumes of 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonate) and hydrogen peroxide; Kirkegaard and Perry] was added to each well. The plates were checked spectrophotometrically at 414 nm until the optical density reading of the 1:160 dilution of the positive control on the fusion protein-containing wells minus the background on the carrier protein-containing wells was equal to 0.5. The plates were then read immediately. A serum dilution was considered positive if the net absorbance (fusion protein well minus carrier protein well) was 3 standard deviations or

more above the mean absorbance of the negative serum wells.

**MAb to p23.** A MAb was produced by fusion of splenic cells from an immunized female BALB/c mouse (4 to 8 weeks old) to NSO/1. The mouse was initially immunized with 200 μg of the fusion protein in DPBS emulsified in an equal volume of complete Freund's adjuvant (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) supplemented with 5 mg of desiccated *Mycobacterium tuberculosis* (Difco) per ml. The mouse received five booster injections of 100 μg of fusion protein in DPBS intraperitoneally every 2 weeks. Three days after the final injection, the spleen was harvested, and a single-cell suspension of splenocytes was obtained over a fine-mesh stainless-steel screen. Hybridomas were obtained essentially as previously described (8). The fusion was performed with 50% (wt/vol) polyethylene glycol 1500 (Boehringer Mannheim) in 75 mM HEPES (*N*-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid [pH 8.0]) at a spleen-myeloma cell ratio of 5:1. The cells were initially plated out at 5 × 10<sup>4</sup> myeloma cells per well of a 96-well flat-bottom cluster tray (Costar, Cambridge, Mass.). Hybridomas were selected by growth for 14 days in complete medium (Dulbecco's modified Eagle medium with 4,500 mg of D-glucose per liter [GIBCO] per liter, 2 mM L-glutamine, 100 U of penicillin G per ml, 100 μg of streptomycin per ml, 10% NCTC 109, 5 × 10<sup>-5</sup> M 2-mercaptoethanol, and 10 mM HEPES) supplemented with 20% (vol/vol) of fetal calf serum (GIBCO) and HAT (10<sup>-4</sup> M hypoxanthine, 4 × 10<sup>-7</sup> M aminopterin, 1.6 × 10<sup>-5</sup> M thymidine; Sigma). Subsequently, the cells were grown in complete medium with 20% fetal calf serum and HT (HAT medium without aminopterin; Sigma) for 7 days and then in complete medium with 20% fetal calf serum. Supernatants from wells containing growing hybridomas were screened for selective reactivity with the fusion protein and not with the carrier protein in an ELISA. Hybridomas from antibody-positive wells were cloned twice by limiting dilution in 96-well trays with BALB/c thymus cells (one thymus per 60 wells) as a feeder layer.

**Immunoelectron microscopy.** Spirochetes were removed from BSK II medium by centrifugation at 7,000 × g and 20°C for 20 min and washed two times by centrifugation at 7,000 × g and 10°C for 20 min in Hank's balanced salt solution (Bio-Whittaker, Walkersville, Md.). Following the second wash, spirochete pellets were fixed for 30 min in 4% formaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Ft. Washington, Pa.) in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) to stabilize their outer membranes. Fixed pellets were washed four times in Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-free PBS and sequentially incubated in 0.1 M glycine (pH 7.4)-PBS containing 1% BSA (PBS-BSA) for 30 min each. Spirochete pellets were incubated with supernatant containing MAb 4D7F5, a control isotype-matched mouse MAb, or PBS-BSA alone for 2 h at 20°C. Following three 5-min washes with PBS, spirochete pellets were incubated with goat anti-mouse IgG-10-nm-diameter gold conjugate (Amersham Life Sciences), diluted 1:20 in PBS-BSA, for 60 min at 20°C. Pellets were washed three times for 5 min with PBS and postfixed with 2.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences) in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4). The pellets were osmicated, stained en bloc with uranyl acetate, dehydrated, and embedded in Spurr's resin. Thin sections were cut, stained with uranyl acetate-lead citrate, and viewed with a Philips CM 10 transmission electron microscope.

**Nucleotide sequence accession numbers.** The *ospC* sequences from *B. burgdorferi* 2591 and B31 have been as-

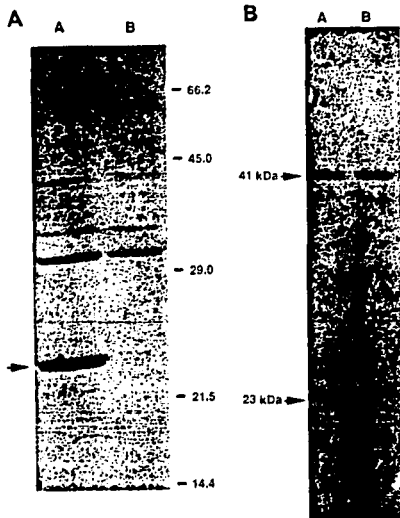


FIG. 1. Coomassie blue-stained polyacrylamide gel (A) and immunoblot (B) of sonicated *B. burgdorferi* 2591 (lane A) and B31 (lane B). In panel A, the arrowhead indicates a protein band corresponding to p23. Molecular mass (in kilodaltons) markers are shown on the right. In panel B, immunoblot reacted with serum from a patient with early Lyme disease. The secondary antibody is goat anti-human IgM. Arrowheads designate bands corresponding to the 41-kDa flagellar protein and the 23-kDa (p23) protein.

signed GenBank accession numbers U01892 and U01894, respectively.

## RESULTS

**Serologic reactivity with p23.** Immunoblot analysis was performed on randomly selected sera from 79 patients who tested positive by ELISA for IgM reactivity to *B. burgdorferi*. The Connecticut strain 2591 was used as the source of antigen for both the ELISA and immunoblot studies. The bands most commonly seen on IgM immunoblot corresponded to proteins with molecular masses of 23, 41, 60, 66, and 31 kDa. The 23-kDa band was present in 98.7% (78 of 79) of the immunoblots. In 15% (12 of 79) of the specimens, the 23-kDa band was found in conjunction with either the 60- or 66-kDa band. The 23- and 41-kDa bands occurred simultaneously in 82% (65 of 79) of the serum samples. The 41-kDa band was never present without the 23-kDa band.

**Molecular characterization of p23.** Analysis of the strain 2591 sonicate by SDS-PAGE stained with Coomassie blue demonstrated the expression of an abundant protein (p23) with a mobility corresponding to a molecular mass of approximately 23 kDa (Fig. 1A, lane A). Examination of the protein pattern from *B. burgdorferi* B31 isolated in North America demonstrated the lack of a detectable 23-kDa protein (Fig. 1A, lane B). Both strains had been grown under the same conditions. An immunoblot of these electrophoretic patterns with serum from a patient with an early stage of Lyme disease demonstrated strong IgM reactivity to the 41-kDa flagellar antigen and relatively weak reactivity to

the 37-, 39-, and 75-kDa antigens from both strains (Fig. 1B). However, only with the strain 2591 sonicate was there detectable IgM reactivity with the 23-kDa protein (Fig. 1B, lane A). No additional antigen reactivity was detected in the lane containing the sonicate of strain B31.

An initial attempt to obtain a partial amino acid sequence of p23 by microsequencing of the protein after transfer to a polyvinylidene difluoride membrane (19) revealed a blocked amino terminus. Therefore, p23 was purified from a preparative SDS-PAGE by electroelution for cleavage to allow isolation of internal fragments of the protein for sequencing. An initial attempt at chemical fragmentation with cyanogen bromide did not indicate a significant change in p23 mobility on SDS-PAGE. Consequently, the protein was digested with trypsin, and two resultant peptide fragments were isolated by reverse-phase HPLC and sequenced (the sequences of the two peptide fragments, p1 and p2, are shown in Fig. 2). Comparison of the sequences of the two peptide fragments with published sequences of *B. burgdorferi* genes revealed that p23 was homologous to the pC protein isolated from the European *B. burgdorferi* PKo (11). This homology permitted the synthesis of a pair of degenerate oligonucleotides in the appropriate orientation for amplification by PCR of a 104-bp product from strain 2591 genomic DNA. This product was radiolabeled and used as a probe for cloning a 3-kb *Pst*I fragment. DNA sequence analysis of the 3-kb *Pst*I fragment identified an open reading frame encoding a 212-amino-acid protein with an estimated molecular mass of 22,250 Da (Fig. 2). An identical match between the predicted amino acid sequence of this gene and the sequence of both peptides confirmed this sequence to be the gene coding for p23. Comparison of p23 from strain 2591 with pC from strain PKo revealed 83% identity by nucleotide sequence and 75% identity by amino acid sequence (Fig. 3). These results strongly suggested that p23 is a homologous protein to pC first isolated in Europe, with the differences between the two proteins representing interstrain divergence.

An additional 185-bp region upstream of the AUG translation start codon of the p23 open reading frame was also sequenced (Fig. 2). The analysis of this region revealed a putative promoter containing consensus -35 and -10 hexamer sequences from *E. coli* (20) separated by 17 bp, as well as a consensus ribosomal binding site sequence (12) 9 bp upstream of the start codon.

**Transcriptional start site.** To confirm whether the identified putative promoter sequence was the active site for transcription of p23, primer extension analysis was performed to ascertain the transcriptional start site (Fig. 4). We used a 17-mer primer and RNA from strain 2591 and mapped the major p23 transcript start site 20 bp upstream of the AUG translation start codon and 7 bp downstream from the -10 hexamer (Fig. 2). Longer exposure of the autoradiogram did not identify the presence of any longer transcript, suggesting there were no additional upstream promoters significantly contributing to the transcriptional activity of the p23 gene.

**Expression of the p23 recombinant protein.** On the basis of our knowledge of the complete coding sequence of p23, oligonucleotide primers were synthesized to amplify p23 by PCR from strain 2591 genomic DNA for expression in recombinant form. To avoid potential difficulty during isolation of the expressed protein, primers were selected so that the 20 amino acid residues composing the leader peptide were deleted from the final recombinant product (4, 11). The amplified p23-encoding product was inserted in frame with the carrier protein of the expression vector pGEX-2T. After induction with IPTG, an approximately 46-kDa fusion pro-

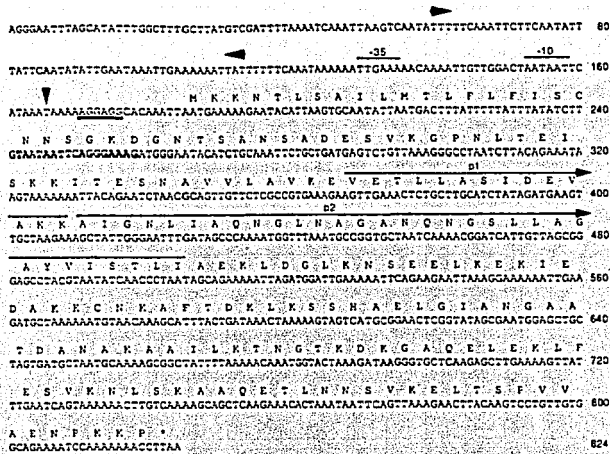


FIG. 2. Nucleotide sequence of p23 gene from strain 2591. The deduced amino acid sequence in single-letter designation is also shown. The sequences of the two tryptic peptide fragments obtained from 2591 (p1 and p2) are indicated by labeled arrows above the sequences. Consensus -10 and -35' promoter hexamers from *E. coli* and the consensus ribosomal binding site (heavy underline) are shown. The downward-pointing arrowhead designates the transcriptional start site as determined by primer extension analysis. The sequence between the horizontal arrowheads (nucleotide positions 60 to 113) designates the deletion in strain B31. The sequence complementary to the 17-mer oligonucleotide used for primer extension and Northern blot analysis is shown in boldface print (nucleotide positions 242 to 258). The stop codon (TAA) is marked by an asterisk.

tein was obtained. The fusion protein was purified from the *E. coli* lysate by use of glutathione-agarose beads, which bind to the carrier protein. To confirm the identity of immunologic reactivity of native p23 and recombinant p23, patient serum with strong IgM reactivity to p23 from a sonicate on an immunoblot was adsorbed with the fusion protein attached to glutathione beads. For controls, the serum was also adsorbed with glutathione beads alone and beads with only the carrier protein attached. As shown in Fig. 5, only adsorption with beads attached to the fusion protein removed completely the serum's reactivity to p23 on

an immunoblot. Adsorption did not affect the serum's reactivity to the other proteins on the blot.

**MAb against p23.** Splenocytes from a mouse immunized with the p23-containing fusion protein was used to obtain hybridomas producing MAbs to p23. Hybridoma supernatants were screened by ELISA for selective reactivity to the fusion protein and lack of binding to the carrier protein. Antibody from several of the hybridoma clones demonstrated particularly strong binding to both the fusion protein and native p23 on immunoblot. To determine the localization of p23, supernatant from one of these clones, 4D7F5, was

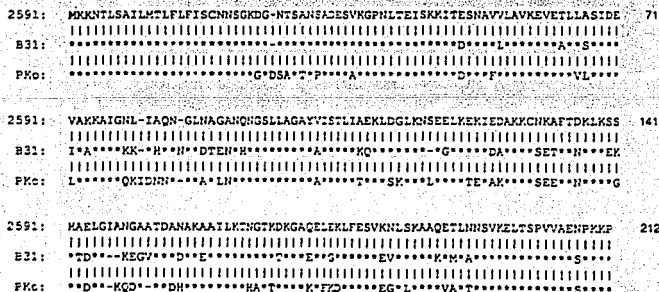


FIG. 3. Comparison of the amino acid sequences of OspC (p23 and pC) from three different *B. burgdorferi* isolates. Single-letter representation of the deduced amino acid sequence of OspC is based on sequencing of genomic DNA from strains 2591 (this paper), B31 (this paper), and PKo (10). The identity of the amino acid sequence in B31 and PKo with 2591 is indicated by an asterisk below the designated position. Amino acid substitutions are represented by the placement of an appropriate letter below the position. Spaces (-) have been included to optimize the match among the proteins.

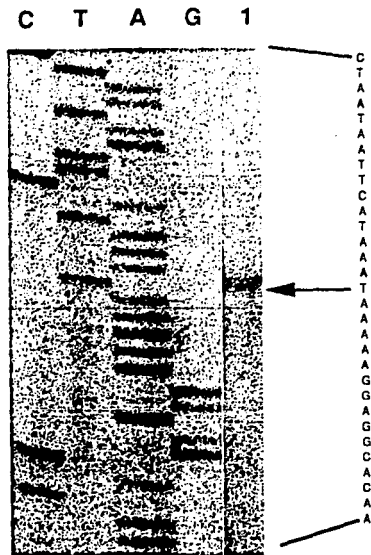


FIG. 4. Determination of the 5' end of *p23* mRNA from *B. burgdorferi* 2591 by primer extension analysis. The size of the reverse transcriptase primer extension product of *p23* mRNA was compared to a DNA sequencing ladder of *p23* from strain 2591. The analysis was performed as described in Materials and Methods. Lanes C, T, A, and G represent DNA sequencing reactions with the appropriate dideoxynucleotide triphosphate by using the same 17-mer oligonucleotide primer used for primer extension of mRNA. Lane 1 shows the primer extension product. The sequence to the right of lane 1 is the sequence in the region of the 5' end of *p23* mRNA, and the arrow indicates the residue at the 5' end of the extended product.

selected for use in immunoelectron microscopy of strain 2591. As shown in Fig. 6, *p23* was found to be expressed on the outer surface of the spirochete. A control, isotype-matched antibody did not bind (data not shown). In addition, MAb 4D7F5 did not label strain B31, confirming the lack of expression of *p23* by this strain (data not shown).

**Molecular defect in *p23* gene from strain B31.** The lack of reactivity of the sera and the MAbs to both the B31 sonicate and whole organism led us to investigate the molecular reason for the lack of expression of *p23* in this strain. Northern blot analysis for *p23* mRNA revealed the strong expression of an approximately 700-bp transcript from strain 2591 and a very weak signal of the same size from strain B31 (Fig. 7). Examination of the RNA stained with ethidium bromide had revealed that an equivalent amount of RNA from each strain was loaded in the gel and that there was no appreciable degradation of the RNA. In addition, primer extension analysis also suggested a significantly reduced level of *p23* mRNA in strain B31 (data not shown). Also, the size of the *p23* primer extension termination product from strain B31 was found to be 1 base longer than the transcript from strain 2591 (data not shown). To gain a better understanding of the reason for the relative lack of *p23* expression

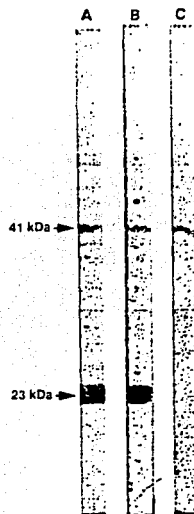


FIG. 5. Removal of IgM anti-*p23* reactivity from serum by adsorption with recombinant *p23*. The IgM immunoblot of sonicate of *B. burgdorferi* 2591 with patient serum after adsorption on glutathione beads alone (lane A) revealed strong reactivity with native *p23*. Lane B shows reactivity of serum after adsorption on carrier protein attached to glutathione beads. Lane C shows complete removal of serum's reactivity after adsorption with *p23* fusion protein attached to glutathione beads. Reactivity with other proteins including the 41-kDa flagellar protein was not affected.

by strain B31, we proceeded to clone and sequence the *p23* gene from strain B31 in the same fashion as we had done previously for strain 2591. Comparison of the deduced amino acid sequences of *p23* from strains 2591 and B31 as well as pC from PKo is shown in Fig. 3. *p23* from strain B31 was found to contain 210 amino acids, 2 less than the other two homologs, and shares 80% amino acid sequence identity and 85% nucleotide sequence identity with *p23* from strain 2591. Comparison of the proteins from the three strains showed conservation of sequence at the 5' (mostly leader peptide sequence) and 3' ends of the protein, with increased variability in the central region.

Analysis of the B31 DNA sequence 5' to the coding region of *p23* revealed a 54-bp deletion upstream to the consensus -10 and -35 promoter sequences found to be the active promoter region in strains 2591 and B31. The finding of this deletion in close proximity to the functional promoter region suggested the loss of an enhancing element which results in low transcriptional activity of *p23* and lack of expression of the *p23* protein in strain B31.

To confirm that the *p23* gene from B31 could encode antigenic protein, the coding region of *p23* was cloned into an expression vector and expressed in *E. coli* as a fusion protein. The recombinant *p23* protein derived from strain B31 was as strongly reactive with sera and the MAbs as the native and recombinant forms of *p23* from strain 2591 (data not shown).

**Use of recombinant *p23* for testing of sera.** On the basis of



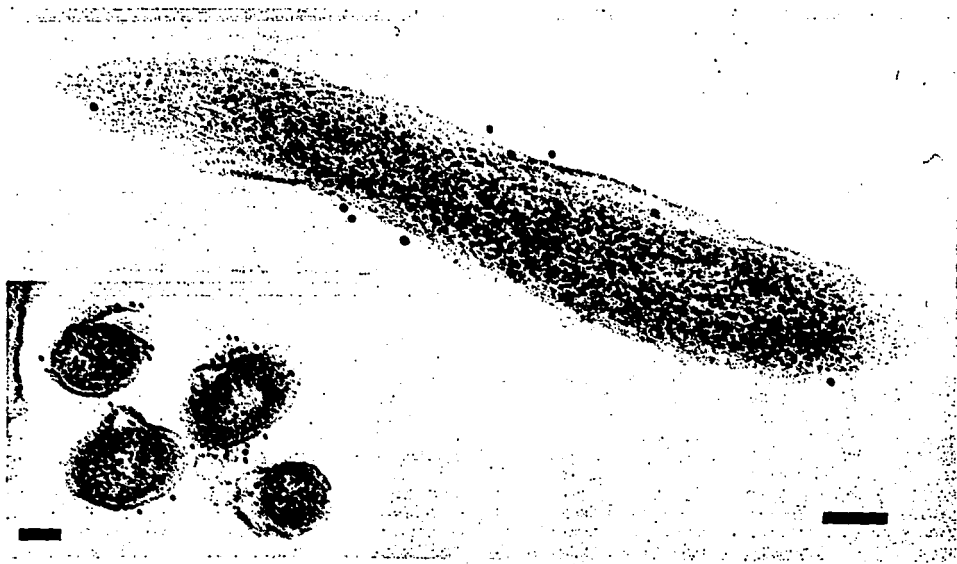


FIG. 6. Immunoelectron micrograph of thin-sectioned *B. burgdorferi* 2591 labeled with 4D7F5, an MAb with reactivity to p23. Localization of the MAb was detected with goat anti-mouse IgG conjugated to 10-nm-diameter gold beads. The immunogold is seen along the outer surface (see insert of cross-section view). Bar, 0.1  $\mu$ m.

our observation that IgM reactivity to p23 may be a significant serologic marker for early stages of Lyme disease, we proceeded to test the feasibility of using recombinant p23 in an ELISA. We initially tested sera from 15 patients with clinically suspected Lyme disease and positive IgM immunoblots with a minimum of three positive bands including reactivity to p23. All 15 of these serum samples were

strongly positive by the recombinant p23 ELISA. Sera from five patients with syphilis, 10 patients with high-titered rheumatoid factor, 5 patients with Epstein-Barr virus infection, and 10 patients with high-titer antinuclear antibodies all tested negative with this assay. All of these sera also tested negative when examined by immunoblot with a sonicate from strain 2591.

## DISCUSSION

Establishing the diagnosis of Lyme disease continues to rely on serologic confirmation of exposure to the causative agent, *B. burgdorferi*, in the setting of characteristic clinical findings. Recognizing Lyme disease in the early stages can be difficult, however, because these patients may not manifest the characteristic rash or may have only nonspecific flu-like symptoms (25). This difficulty of diagnosis is compounded by the delayed emergence of a humoral response to the spirochete as detected by available serologic tests (25). These tests, which currently lack standardization, also do not readily distinguish between reactivity to *B. burgdorferi* proteins and cross-reactive proteins from commensal or other pathogenic organisms (13, 16). Delay in establishing the diagnosis of Lyme disease in its early stages is clinically important because timely institution of appropriate antibiotic treatment can prevent the serious sequelae from this potentially chronic infection (7, 26).

Initial studies with immunoblot analysis of patients from North America with the early manifestations of Lyme disease found IgM reactivity predominantly against the 41-kDa flagellar protein of *B. burgdorferi* (3, 6). Detection of anti-

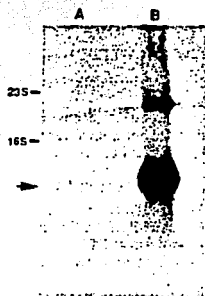


FIG. 7. Northern blot analysis of p23 transcript. Total cellular RNA (15  $\mu$ g per lane) was isolated from *B. burgdorferi* B31 (lane A) and 2591 (lane B), fractionated in a formaldehyde denaturing gel, transferred to a nylon membrane, and hybridized to a 17-mer oligonucleotide based on the sequence of p23. The arrowhead designates the p23 transcript. The positions of 23S and 16S rRNA are indicated.

body to this protein, however, is not specific for Lyme disease, as flagellar protein sequences are conserved among spirochetes, including the oral pathogens found commonly in periodontal disease (17).

In similar studies of patients in Europe, utilizing different strains of *B. burgdorferi* as the source of antigen, IgM was most frequently detected against an abundant 21- to 22-kDa protein, which was designated pC (32). A major protein with this size was detected in approximately 45% of *B. burgdorferi* strains from Europe but only rarely observed in North American isolates (31, 32).

Recently, Dressler et al. reported the most prominent IgM response in American patients with early stages of the disease was to a 21-kDa protein (10). This protein was reported to be reactive with an MAbs specific for pC. This finding contrasts with this same group's previous finding of a predominant early response to the 41-kDa flagellar antigen (6). The discrepancy between these two findings was attributed to different antigen preparations despite the use of the same isolate, highlighting the potential confusion introduced by the current lack of test standardization.

In our laboratory we have found IgM reactivity predominantly to a protein with a molecular mass of 23 kDa (p23) in sera from patients with early stages of Lyme disease. In our serologic tests we have used a Connecticut isolate, *B. burgdorferi* 2591, which produces an abundant protein with a size of 23 Da. We therefore sought to identify and characterize p23, compare it to the European pC, and express it in recombinant form for testing in an easily standardized assay for the detection of a serologic response in early stages of Lyme disease.

We cloned and sequenced the p23 gene from strain 2591 and predicted the protein to contain 212 amino acids with a molecular mass of 22,250 kDa. Comparison of the nucleic acid and predicted amino acid sequences of p23 with those of pC from the European isolate PKo revealed a high degree of homology (11). Furthermore, as recently reported for pC, we have localized p23 to the outer surface of 2591 by immunoelectron microscopy (30). Thus, p23 and pC are homologs of the same outer surface protein, OspC.

During the course of these studies, we confirmed the lack of expression of OspC by strain B31, an isolate which has been commonly used as the source of antigen for commercially available serologic assays in North America. Strain B31, as well as strain 2591, belongs to genospecies I, *B. burgdorferi sensu stricto*, whereas strain PKo belongs to genospecies III, group VS461 (1, 29, and unpublished results). We could not detect expression of OspC in a B31 sonicate by SDS-PAGE and immunoblot and on the whole organism by immunoelectron microscopy. We did confirm however that the *ospC* gene is present in B31 and identified a deletion of 54 bp in the 5' noncoding region of the gene located just upstream of -35 and -10 consensus *E. coli* promoter sequences. Northern blot analysis of B31 revealed a low level of *ospC* mRNA, and primer extension studies showed a transcription start site for *ospC* 1 base upstream of that found for strain 2591. Recently, Marconi et al. have reported that *ospC* transcription in some strains may be under the control of one or more promoters in addition to the major functional promoter that we have described in this paper (18). We could not detect in strains 2591 and B31, however, any evidence of longer primer extension termination products by overexposure of the autoradiographs.

We propose that the deleted 54-bp segment contains an enhancer element(s) required for increased *ospC* transcriptional activity and detectable levels of expression of OspC.

At this time, the evidence supporting this contention remains circumstantial. Additional supportive documentation of a regulatory element of transcription in the deleted sequence would require gene transfer technology which is currently unavailable for *Borrelia* species.

Recently, Marconi et al. (18) and Sadziene et al. (24) localized the *ospC* gene to a 26- to 27-kDa circular plasmid, the first gene mapped to a circular plasmid in *B. burgdorferi*. Marconi et al. mapped the gene by using a variety of electrophoretic separation techniques and Southern blotting. Sadziene et al. used a group of B31-derived isolates which contained their linear chromosome and circular plasmids but had been antibody selected for the loss of a variable number of their linear plasmids. Sadziene et al. also found a correlation of an isolate's ability to express OspC and the loss of a linear plasmid of 16 kb (lp 16). They hypothesized that a protein or RNA encoded by lp 16 may function as a repressor of *ospC* expression. Loss of this plasmid could thereby lead to the loss of repression and new expression of the protein. In addition, these investigators noted that the loss of lp 16 also led to a failure of the mutant to grow on solid medium. Interestingly, in a recent report, Wilske et al. described the new expression of OspC by nonexpressing isolates after their growth on solid medium (30). The molecular reason(s) for these changes in growth requirements and how they may affect the regulation of the expression of proteins including OspC is as yet unexplained. How these findings and ours may relate to each other in the regulation of *ospC* transcription remains to be elucidated.

To determine whether the coding region of *ospC* from B31 is capable of encoding an immunologically detectable protein, we expressed recombinant OspC from B31 in *E. coli*. We found that patients' sera and MAbs reactive with p23 (OspC) from strain 2591 were strongly reactive with recombinant OspC from strain B31. Because of the observation that p23 from strain 2591 is an early immunodominant target of the humoral response in Lyme disease, we produced a recombinant form of the protein for testing in diagnostic assays. Preliminary studies with recombinant p23 suggest that it may be a sensitive and specific antigen for serologic detection early in disease. In addition, immunoassays which utilize recombinant forms of antigens have the added advantage of being easily standardized. Currently, we are extending these studies and are optimizing the assay to assess the limits of early detection.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Public Health Service grant 5R29-AR39361 (S.J.P.).

We thank Juris Ozols for assistance with the protein sequencing and Naomi Rothfield and Peter Serlow for advice during the course of these studies and for critical review of the manuscript.

#### REFERENCES

- Baranton, G., D. Postic, I. Saint Girons, P. Boerlin, J.-C. Piffaretti, M. Assous and P. A. D. Grimont. 1992. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov., and Group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:378-383.
- Barbour, A. G. 1984. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J. Biol. Med.* 57:521-525.
- Barbour, A. G., S. F. Hayes, R. A. Heiland, M. E. Schrupp, and S. L. Tessler. 1986. A *Borrelia*-specific monoclonal antibody binds to a flagellar epitope. *Infect. Immun.* 52:549-554.
- Bassford, P. J., Jr., T. J. Silhavy, and J. R. Beckwith. 1979. Use of gene fusion to study secretion of maltose-binding protein into *Escherichia coli* periplasm. *J. Bacteriol.* 139:19-31.

FALLA DE ORIGEN

5. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
6. Craft, J. E., D. K. Fischer, G. T. Shimamoto, and A. C. Steere. 1986. Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme disease. Appearance of a new immunoglobulin M response and expansion of the immunoglobulin G response late in the illness. *J. Clin. Invest.* 78:934-939.
7. Dattwyler, R. J., D. J. Volkman, S. M. Conaty, S. P. Platkin, and B. J. Luft. 1990. Amoxicillin plus procnebened versus doxycycline for treatment of erythema migrans borreliosis. *Lancet* 336:1404-1406.
8. de St. Groth, S. F., and D. Scheidegger. 1980. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Methods* 35:1-21.
9. Dias, F., R. W. Ryan, and H. M. Feder. 1992. Interpretation of IgM western immunoblot banding patterns in patients suspected of having early Lyme disease; abstr. A100, p. 19. Program Abstr. V Int. Conf. on Lyme Borreliosis, Arlington, Va.
10. Dressler, F., J. A. Whalen, B. N. Reinhardt, and A. C. Steere. 1993. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J. Infect. Dis.* 167:392-400.
11. Fuchs, R., S. Jauris, F. Lottspeich, V. Preac-Mursic, B. Wilske, and E. Soutschek. 1992. Molecular analysis and expression of a *Borrelia burgdorferi* gene encoding a 22 kDa protein (pC) in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 6:503-509.
12. Gold, L., D. Pribnow, T. Schneider, S. Shinedling, B. S. Singer, and G. Stormo. 1981. Translation initiation in prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* 35:365-403.
13. Hansen, K., J. M. Bangsberg, H. Fjordvang, N. S. Pedersen, and P. Hindersson. 1988. Immunochemical characterization of and isolation of the gene for a *Borrelia burgdorferi* immunodominant 60-kilodalton antigen common to a wide range of bacteria. *Infect. Immun.* 56:2047-2053.
14. Jones, K. A., R. Yamamoto, and R. Tijan. 1985. Two distinct transcription factors bind to the HSV thymidine kinase promoter in vitro. *Cell* 42:559-572.
15. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227:680-685.
16. Magnarelli, L. A., J. A. Anderson, and R. C. Johnson. 1987. Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. *J. Infect. Dis.* 156:183-188.
17. Magnarelli, L. A., J. N. Miller, J. F. Anderson, and G. R. Riviere. 1990. Cross-reactivity of nonspecific treponemal antibody in serologic tests for Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 28:1276-1279.
18. Marconi, R. T., D. S. Samuels, and C. F. Garon. 1993. Transcriptional analyses and mapping of the *ospC* gene in Lyme disease spirochetes. *J. Bacteriol.* 175:926-932.
19. Matsudaira, P. 1987. Sequence from picomole quantities of protein electrobotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* 262:10035-10038.
20. McClure, W. R. 1985. Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 54:171-204.
21. McKnight, S. L., and R. Kingsbury. 1982. Transcription control signals of a eukaryotic protein-coding gene. *Science* 217:316-324.
22. Ozols, J. 1990. Covalent structure of liver microsomal flavin-containing monooxygenase form 1. *J. Biol. Chem.* 265:10289-10299.
23. Ozols, J., F. S. Heinemann, and C. Gerard. 1980. High pressure liquid chromatography of polar and hydrophobic peptides of cytochromes from microsomal membranes. p. 417-429. In C. Birr (ed.), *Methods in peptide and protein sequence analysis*. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
24. Sadzienie, A., B. Wilske, M. S. Ferdows, and A. G. Barbour. 1993. The cryptic *ospC* gene of *Borrelia burgdorferi* B31 is located on a circular plasmid. *Infect. Immun.* 61:2192-2195.
25. Steere, A. C. 1989. Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* 321:586-596.
26. Steere, A. C., G. J. Hutchinson, D. W. Rahn, L. H. Sigal, J. E. Craft, E. T. DeSanna, and S. E. Malawista. 1983. Treatment of the early manifestations of Lyme disease. *Ann. Intern. Med.* 99:22-26.
27. Summers, W. C. 1970. A simple method for extraction of RNA from *E. coli* utilizing diethyl pyrocarbonate. *Anal. Biochem.* 33:459-463.
28. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.
29. Wilske, B., V. Preac-Mursic, U. B. Gobel, B. Graf, S. Jauris, E. Soutschek, E. Schwab, and G. Zumstein. 1993. An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31:340-350.
30. Wilske, B., V. Preac-Mursic, S. Jauris, A. Hofmann, I. Pradel, E. Soutschek, E. Schwab, G. Will, and G. Wanner. 1993. Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 61:2182-2191.
31. Wilske, B., V. Preac-Mursic, G. Schierz, and V. Busch. 1986. Immunochemical and immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Ser. A* 263:92-102.
32. Wilske, B., V. Preac-Mursic, G. Schierz, R. Kuhbeck, A. G. Barbour, and M. Kramer. 1988. Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 539:126-143.

FALLA DE ORIGEN

## Use of Recombinant OspC from *Borrelia burgdorferi* for Serodiagnosis of Early Lyme Disease

STEVEN J. PADULA,<sup>1\*</sup> FELICIANO DIAS,<sup>2</sup> ALICIA SAMPIERI,<sup>1</sup> ROBERT B. CRAVEN,<sup>3</sup>  
AND RAYMOND W. RYAN<sup>2</sup>

Division of Rheumatic Diseases, Department of Medicine<sup>1</sup> and Department of Laboratory Medicine,<sup>2</sup> University of Connecticut Health Center, Farmington, Connecticut 06030, and Division of Vector-Borne Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Fort Collins, Colorado 80522<sup>3</sup>

Received 15 February 1994/Returned for modification 21 March 1994/Accepted 18 April 1994

Infection with *Borrelia burgdorferi*, the etiologic agent of Lyme disease, is associated with an early and dominant humoral response to the spirochete's 23-kDa outer surface protein C (OspC). We have cloned and expressed OspC as a fusion protein in *Escherichia coli* and have shown that patient serum samples react with it in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (S. J. Padula, A. Sampieri, F. Dias, A. Szczepanski, and R. W. Ryan. *Infect. Immun.* 61:5097-5105, 1993). Now we have compared the detection of *B. burgdorferi*-specific immunoglobulin M antibodies in 74 individuals with culture-positive erythema migrans by a whole-cell ELISA, immunoblot, and the recombinant OspC (rOspC) ELISA. Seventy-six negative controls were also studied. With all of the tests, there was a statistically significant association between the duration of disease and the frequency of a positive result. With the rOspC ELISA, the predictive value of a positive test was 100% and the predictive value of a negative test was 74%. Similar results were obtained with the whole-cell ELISA and with the immunoblot using as the source of test antigen a strain of *B. burgdorferi* which expresses abundant levels of OspC. We conclude that the use of rOspC in an ELISA is a convenient, readily automated, and easily standardized test for the serodiagnosis of early Lyme disease.

Lyme disease is a multisystemic illness caused by the tick-borne spirochete *Borrelia burgdorferi* (4, 7, 26). Early manifestations of the infection include an expanding, erythematous rash at the site of the tick bite, called erythema migrans (EM), and a nonspecific flu-like illness (25). Recognition of the distinctive EM rash is important, as prompt treatment with appropriate antibiotics usually prevents the late sequelae of neurologic, cardiac, or musculoskeletal organ involvement (27). EM, however, may not be recognized in some cases of Lyme disease (25). Failure by the patient to recognize the rash, an atypical appearance of the rash, and possibly the lack of development of a skin lesion may account for the variable recognition of EM in patients with Lyme disease.

In patients without recognized EM but suspected of having Lyme disease, establishment of the diagnosis is usually dependent on serologic confirmation of exposure to *B. burgdorferi*. Accurate serodiagnosis, however, has been complicated by delayed humoral response after infection and by antibodies to other bacteria which cross-react with proteins from *B. burgdorferi* (19, 24). Both the lack of standardization of antigen preparations used for testing and nonconformity in interpretation of results have also contributed to the confusion surrounding the serodiagnosis of this disease (15).

Using immunoblots of lysates from *B. burgdorferi* 2591, we found predominant immunoglobulin M (IgM) reactivity to a 23-kDa protein in serum samples from patients with early Lyme disease (10, 20). We cloned and sequenced the gene encoding this protein and found that it is OspC, an outer surface protein (20). We expressed recombinant OspC (rOspC) as a fusion protein in *Escherichia coli* and showed that

serum samples from patients with Lyme disease react in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with rOspC (20). In the present study, we compared the detection of *B. burgdorferi*-specific IgM antibodies in patients with culture-positive EM by a whole-cell (WC) ELISA, immunoblot, and the rOspC ELISA.

### MATERIALS AND METHODS

**Study groups.** Group 1 consisted of serum samples from 74 individuals with EM. In all of these cases, *B. burgdorferi* was cultured from a biopsy specimen of the lesional skin. Serum samples were obtained from the Centers for Disease Control and Prevention, Fort Collins, Colo. The individuals had contracted the infection in the northeastern and midwestern United States. This group included group 1a, with serum samples from 20 patients at the time of EM. These individuals could not give a reliable estimate of the duration of the rash, but the rash was present when serum samples were obtained. Groups 1b, 1c, and 1d consisted of serum samples from 54 individuals who were able to accurately state the number of days between the onset of EM and the time sera were obtained; group 1b, 19 serum samples at 1 to 7 days; group 1c, 20 serum samples at 8 to 19 days; and group 1d, 15 serum samples at 20 to 90 days. All of the patients had received treatment with antibiotics upon presentation with EM. Group 2 consisted of controls as follows: group 2a, serum samples obtained from 20 healthy individuals with no prior history of Lyme disease; group 2b, serum samples obtained from 50 healthy volunteer donors living in areas where Lyme disease is not endemic; and group 2c, serum samples from 6 patients with severe periodontitis. Patients with periodontitis have chronic exposure to high levels of oral spirochetes and can develop antibodies which cross-react with proteins from *B. burgdorferi* (19). All serum samples were stored at -20°C prior to analysis.

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Medicine, Division of Rheumatic Diseases, University of Connecticut Health Center, 263 Farmington Ave., Farmington, CT 06030-1310. Phone: (203) 679-3290. Fax: (203) 679-1287. Electronic mail address: PADULA@MBCG.UCHC.EDU.

Specimens were tested without knowledge of the status of the donor.

**Antigen preparation.** *B. burgdorferi* 2591, originally isolated from a white-footed mouse caught in East Haddam, Conn., was obtained from the Connecticut Agricultural Experiment Station, New Haven, Conn. (2). The spirochetes were grown in BSK II medium in a closed flask at 33°C for 10 to 14 days as previously described (3). The gene encoding rOspC was cloned from *B. burgdorferi* 2591 as previously described (20). rOspC was expressed as a fusion protein with glutathione S-transferase at the amino terminus to facilitate its purification from *E. coli* proteins as previously described (20). Glutathione S-transferase was also expressed and purified in exactly the same fashion as the fusion protein for use as a control in the ELISA.

**WC ELISA.** The ELISA for IgM and IgG anti-*B. burgdorferi* antibodies was performed as previously described with minor modifications (16, 18). Briefly, *B. burgdorferi* 2591 spirochetes were collected from growth medium by centrifugation at 35,000 × g for 35 min, washed three times, and resuspended in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) (Sigma, St. Louis, Mo.) at a concentration of 10<sup>8</sup> spirochetes per ml. Fifty microliters of the spirochete solution was added to alternate wells of a 96-well, flat-bottom microdilution plate (Nunc-Immunoplate; Marsh Biomedical Products, Rochester, N.Y.). Fifty microliters of DPBS was added to the remaining wells as a control for nonspecific binding. The plates were dried overnight at 37°C before the assay was performed. Patient serum samples were tested at dilutions of 1:160 and 1:320 in DPBS-0.05% Tween 20 (DPBS-T). Positive and negative control serum samples were also included on each plate. Goat anti-human IgG or IgM conjugated to horseradish peroxidase (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, Md.) was used as secondary antibody. Plates were read when the net absorbance value (the difference in optical density between the antigen-coated well and the DPBS-containing well) of the 1:160 dilution of the positive control serum sample was 0.5 for IgM and 1.0 for IgG. A test serum dilution was considered positive if the net absorbance value was ≥3 standard deviations above the mean net absorbance of the negative serum controls. Serum samples containing positive dilutions of ≥1:160 for IgM or ≥1:320 for IgG were reported as positive. Positive IgG-containing serum samples were further titrated to end point by serial twofold dilutions to 1:5,120. Further titration of positive IgM-containing serum samples was not performed.

**rOspC ELISA.** The ELISA to detect IgM antibodies to rOspC was performed essentially as described previously (20). Preliminary checkerboard titration studies with serum samples containing IgM antibodies to native OspC by immunoblot determined the optimal concentration of the rOspC fusion protein to be 300 ng per well. Sixty microliters of the rOspC fusion protein (5 µg/ml) in DPBS was added to alternate wells of the plate for 12 h at 4°C. An equimolar amount of glutathione S-transferase in DPBS was added as a control antigen to the remaining wells. Patient serum samples serially diluted twofold from 1:40 to 1:1,280 in DPBS-T were added. Plates were read by the microplate spectrophotometer when the net absorbance value (optical density of well with fusion protein minus that of well with glutathione S-transferase) of the 1:160 dilution of the positive serum control was 0.5. A serum dilution was considered positive if the net absorbance was ≥3 standard deviations above the mean net absorbance of the negative serum control wells. Most sera were tested twice in separate assays performed on different days to confirm reproducibility of the results.

**Immunoblot assay.** The IgM and IgG immunoblot assays

using a sonicate of *B. burgdorferi* 2591 were performed as previously described with some modifications (20). Sixty micrograms of spirochetal proteins in loading buffer containing a final concentration of 0.5% sodium dodecyl sulfate and 1.25% 2-mercaptoethanol was heated at 95°C for 5 min and electrophoresed in a discontinuous 12% polyacrylamide-sodium dodecyl sulfate gel (1.5-mm-thick gel, plates (8 by 18 cm), and 130-mm preparative comb) using a vertical-slab electrophoresis unit (model SE 640; Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, Calif.) at 22°C for 2.5 to 3 h at 120 V with buffers described by Laemmli (14). Proteins were transferred from the gel to a nitrocellulose sheet (0.2-µm pore size; Hoefer Scientific Instruments) with a Hoefer TE 62X Transphor II at a constant current of 500 mA at 22°C for 2 h. The nitrocellulose sheets were incubated overnight at 4°C in DPBS with 2% powdered nonfat milk and cut into 3-mm strips. Serum samples diluted 1:100 in DPBS-T with 2% powdered nonfat milk were mixed with the nitrocellulose strips at 22°C for 1 h with agitation and washed three times with DPBS-T. Goat anti-human IgG and IgM conjugated to horseradish peroxidase (Sigma) were added to the strips for 1 h at 22°C and washed three times with DPBS-T. 3,3'-Diaminobenzidine solution (50 mg/100 ml of PBS and 10 µl of 40% hydrogen peroxide) (Sigma) was added and incubated at 22°C for 10 min. The strips were allowed to dry prior to interpretation. The molecular masses of the reactive bands were determined by (i) comparing their mobility with transblotted prestained molecular mass markers (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.) and (ii) comparing their mobility with bands recognized on immunoblots by a serum with well-characterized reactivity. Three different criteria for positivity on the IgM immunoblot were used: the presence of (i) three or more bands; (ii) three or more bands, one of which had to be the 23-kDa protein; or (iii) the 23-kDa protein alone or in combination with any other bands. For the IgG immunoblot, four or more bands were considered positive.

**Statistical analysis.** The association between the length of duration after onset of disease and the rate of positive serologic result was evaluated by the chi-square test. The predictive value of a test was calculated as follows: positive predictive value, number of true-positive test results/number of true-positive and false-positive test results with a particular assay; and negative predictive value, number of true-negative test results/number of false-negative and true-negative test results with a particular assay.

## RESULTS

**IgM antibodies in early Lyme disease.** Nine of twenty serum samples from group 1a patients were positive by IgM immunoblot when three or more bands were used as the positive criteria (Table 1). Eight of the nine serum samples with positive IgM immunoblots demonstrated reactivity with the 23-kDa protein. One serum sample which did not meet the criteria for positivity was reactive with a single band of 23 kDa (patient 16). Six of twenty group 1a serum samples were positive by the IgM ELISA with WCs of *B. burgdorferi* 2591, whereas eight of the twenty serum samples were found to be reactive with rOspC by ELISA. In eight of nine serum samples which demonstrated reactivity with the 23-kDa antigen on immunoblot, reactivity with rOspC by ELISA was also found.

For the group 1b serum samples, 11 of 19 were positive by IgM immunoblot (Table 2). All 11 positive samples showed reactivity to the 23-kDa protein. None of the eight negative samples demonstrated reactivity to the 23-kDa protein. Of the

TABLE 1. IgM reactivity of group 1a serum samples drawn during EM

Patient	IgM reaction								
	ELISA		Immunoblot						
	WC	rOspC	21 kDa	23 kDa	34 kDa	39 kDa	41 kDa	60 kDa	66 kDa
1	-	-					+	+	+
2	+	+		+			+	+	+
3	-	+		+			+	+	+
4	+	+	+		+		+	+	+
5	+	+		+			+	+	+
6	-	-		+			+	+	+
7	+	+		+			+	+	+
8	+	+		+			+	+	+
9	-	+		+			+	+	+
10	+	-					+		+
11	-	-							
12	-	-							
13	-	-							
14	-	-					+		
15	-	-							
16	-	+		+					
17	-	-					+		
18	-	-					+		
19	-	-					+		
20	-	-							

19 samples, 9 were positive by WC IgM ELISA compared with 12 positive samples by rOspC ELISA.

Seventeen of twenty group 1c serum samples were positive by immunoblot (Table 3). All 17 samples contained antibodies which bound both the 23- and 41-kDa proteins. Testing with the WC ELISA yielded positive results with 16 of 20 samples, whereas 17 of the 20 samples tested positive by the rOspC ELISA. There was a perfect correlation between reactivity with

TABLE 2. IgM reactivity of group 1b serum samples drawn 1 to 7 days after onset of EM

Patient	IgM reaction								
	ELISA		Immunoblot						
	WC	rOspC	23 kDa	39 kDa	41 kDa	45 kDa	60 kDa	66 kDa	
21	-	+	+					+	+
22	-	+	+		+			+	+
23	+	+	+		+			+	+
24	+	+	+		+			+	+
25	+	+	+		+			+	+
26	+	+	+		+			+	+
27	+	+	+		+			+	+
28	+	+	+		+		+	+	+
29	+	+	+		+		+	+	+
30	+	+	+		+		+	+	+
31	+	-	+		+		+	+	+
32	-	-							
33	-	-							
34	-	-			+				
35	-	-							
36	-	-							
37	+	+			+				+
38	-	-							
39	-	-						+	+

TABLE 3. IgM reactivity of group 1c serum samples drawn 8 to 19 days after onset of EM

Patient	IgM reaction									
	ELISA		Immunoblot							
	WC	rOspC	23 kDa	31 kDa	39 kDa	41 kDa	45 kDa	60 kDa	66 kDa	88 kDa
40	+	+	+			+		+	+	+
41	+	+	+		+			+	+	+
42	-	+	+			+		+	+	+
43	-	+	+			+		+	+	+
44	+	+	+			+		+	+	+
45	+	+	+			+		+	+	+
46	+	+	+			+		+	+	+
47	+	+	+			+		+	+	+
48	+	+	+			+		+	+	+
49	+	+	+			+		+	+	+
50	+	+	+			+		+	+	+
51	+	+	+			+		+	+	+
52	+	+	+		+			+	+	+
53	+	+	+	+				+	+	+
54	-	+	+		+			+	+	+
55	-	+	+		+			+	+	+
56	-	+	+		+			+	+	+
57	-	-					+			
58	-	-								
59	-	-								

the rOspC ELISA and the 23-kDa protein on immunoblot within this group.

Thirteen of the fifteen group 1d serum samples were positive by IgM immunoblot (Table 4). Twelve of fifteen serum samples were positive by the IgM WC ELISA, and ten of fifteen were positive by the rOspC ELISA.

For all three methods of testing, there was a statistically significant association between longer disease duration and greater frequency of a positive test (Table 5). There was no relationship seen between the results of serologic testing and

TABLE 4. IgM reactivity of group 1d serum samples drawn 20 to 90 days after onset of EM

Patient	IgM reaction									
	ELISA		Immunoblot							
	WC	rOspC	23 kDa	39 kDa	41 kDa	45 kDa	60 kDa	66 kDa	88 kDa	
60	+	+	+			+		+	+	+
61	-	+	+			+		+	+	+
62	-	+	+			+		+	+	+
63	-	-	+			+		+	+	+
64	-	-	+		+			+	+	+
65	-	-	+			+		+	+	+
66	-	-	+			+		+	+	+
67	-	+	+			+		+	+	+
68	-	+	+			+		+	+	+
69	-	+	+	+		+		+	+	+
70	-	+	+			+		+	+	+
71	-	+	+			+		+	+	+
72	-	+	+			+		+	+	+
73	-	-								
74	-	+				+				

TABLE 5. Relation of duration of EM to IgM serologic testing

Patient group	No. of patients	% Positive <sup>a</sup>		
		Immunoblotting <sup>b</sup>	ELISA	
			WC	rOspC
1a	20	45	30	40
1b	19	58	47	63
1c	20	85	80	85
1d	15	87	80	67
2 (a, b, and c)	76	3 <sup>c</sup>	0	0

<sup>a</sup> The association between longer disease duration and greater frequency of a positive test was statistically significant as follows: for immunoblotting,  $\chi^2 = 10.730$ , 3 degrees of freedom, with  $P = 0.013$ ; for WC ELISA,  $\chi^2 = 14.282$ , 3 degrees of freedom, with  $P = 0.003$ ; for rOspC ELISA,  $\chi^2 = 6.821$ , 3 degrees of freedom, with  $P = 0.032$ .

<sup>b</sup> Positive result determined by the criterion of binding three or more bands.

<sup>c</sup> One patient was from an area where Lyme disease is not endemic, and another had no history of Lyme disease.

the geographic region where the patient had contracted the infection (data not shown).

**IgG antibodies in early Lyme disease.** Conceivably, in some of the patients with Lyme disease and negative IgM reactivity, class switching of the anti-*B. burgdorferi* antibodies to IgG may have occurred. Therefore, we tested the serum samples by IgG immunoblots and WC IgG ELISAs. Within group 1a, only 1 of the 20 samples was positive by IgG immunoblot, and it was also positive by IgM immunoblot (patient 4). For 1 of these 20 samples, the IgG WC ELISA was positive and the IgM WC ELISA was negative (patient 3). In group 1b, one serum sample was positive by both IgM and IgG immunoblots (patient 31). One of the three group 1c serum samples which tested negative by IgM immunoblot was reactive with the 23- and 41-kDa proteins by IgG immunoblot (patient 58). The other two IgM immunoblot-negative samples showed reactivity to only the 41-kDa antigen by IgG immunoblot. Both of the group 1d serum samples which were negative by IgM immunoblot were also negative by IgG immunoblot.

**Negative control sera.** To examine the specificity of the serologic testing, we studied 76 control serum samples (group 2). Nineteen of the twenty group 2a samples were negative by IgM immunoblot with the positive criterion of three or more bands. One serum sample bound four bands, including the 41-kDa protein and the 23-kDa antigen. Three of the negative samples bound the 23-kDa protein. Twelve of the twenty serum samples contained reactivity with the 41-kDa protein. The WC and rOspC IgM ELISAs were negative for all 20 samples.

Although these serum samples were obtained from healthy donors without a history of Lyme disease, we were concerned about whether there were some individuals within this group who may have had an asymptomatic infection and thus developed antibodies to *B. burgdorferi*. Therefore, we studied an additional 50 samples obtained from healthy volunteers from Iceland, an area where Lyme disease is not endemic (group 2b). Only 1 of the 50 serum samples met the criterion of three or more bands for a positive IgM blot (41-, 60-, and 66-kDa bands). Twenty of the fifty samples demonstrated reactivity with the 23-kDa antigen, albeit faintly, by IgM immunoblot. None of the 50 samples were positive by the WC and rOspC IgM ELISAs.

As an additional control group, we also studied serum samples obtained from six patients with severe periodontitis (group 2c). None of these samples were positive by IgM

TABLE 6. Comparison of IgM tests for Lyme disease

Test	Indicator			
	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Positive predictive value (%)	Negative predictive value (%)
Immunoblotting <sup>a</sup>				
≥3 bands	68	97	96	76
23-kDa band and ≥2 bands	65	99	98	74
23-kDa band	66	64	64	66
ELISA				
WC	58	100	100	71
rOspC	64	100	100	74

<sup>a</sup> *B. burgdorferi* 2591 containing OspC (23 kDa) was used as the source of antigen.

immunoblot with the positive criterion of three or more bands. Five serum samples reacted with the 41-kDa flagellar protein, and three samples had reactivity with the 23-kDa antigen. All six serum samples were negative for IgM reactivity by the WC and rOspC ELISAs.

There were no group 2 serum samples which were positive by IgG immunoblot or IgG WC ELISA, including the two samples found to be positive by IgM immunoblots.

In Table 6, predictive values of the different serologic tests as determined by the results obtained with the 74 Lyme disease serum samples and the 76 negative serum controls are compared. The results of the immunoblot analysis using three different criteria for a positive test are presented. There were only two Lyme disease samples which did not bind the 23-kDa antigen, but they still fulfilled one of the criteria for a positive blot by binding three or more bands. There was only one example among the Lyme disease culture-positive serum samples of binding to the 23-kDa protein but not binding three or more bands. Because of these infrequent findings, there was no essential difference in the sensitivities of the IgM blots with three different criteria for a positive assay. There was, however, a significant drop-off in specificity when binding of the 23-kDa protein was used as the sole criterion for a positive immunoblot. This reflects the relatively frequent observation of binding to the 23-kDa antigen (usually faintly) among the negative serum controls. In contrast, there were no false-positive results with the WC and rOspC ELISAs. A positive result by either of these two methods, both of which contain OspC, was therefore superior to a positive result by immunoblot, using the positive criterion of binding to the 23-kDa protein, for accurately predicting the presence of disease. The predictive value of a negative result was essentially equivalent for all three methods.

## DISCUSSION

Diagnosis of Lyme disease in patients with early disease who present with distinctive EM is usually not a problem. However, in a significant number of patients, EM may not be recognized and the only manifestation of infection may be nonspecific constitutional complaints. In these patients, serodiagnosis can play an important role in confirming the disease and leading to prompt and appropriate antibiotic treatment. Accurate serodiagnosis for early Lyme disease, however, has been complicated by delayed humoral response to the infection and by the fact that antibodies to other bacteria cross-react with proteins from *B. burgdorferi* (19, 24).

In hope of improving the level of detection of the antibody

FALLA DE ORIGEN

response in early Lyme disease, studies have utilized enriched preparations and recombinant forms of the 41-kDa flagellar protein as the target antigen for serologic testing (5, 8, 13, 17, 21). This approach was prompted by initial immunoblot studies with *B. burgdorferi* lysates in which an early and predominant IgM antibody response to the flagellar protein was demonstrated (9). Use of flagellar protein-based serologic tests may be problematic, however, because of the relatively frequent finding of cross-reactive antibodies to conserved flagellar epitopes from commonly occurring commensal and pathogenic spirochetes, such as those found in the mouth (19, 22).

We and others have recently described another early and dominant antibody response in patients with Lyme disease which is directed to a protein of approximately 23 kDa (1, 11, 20). European investigators had previously described an immunodominant, early antigen of similar molecular mass called pC (12, 29, 30). These early targets of the immune response have now been determined to be OspC, a protein located in the outer membrane of the spirochete (12, 20, 28). Interestingly, stained gels of only a small percentage of lysates of strains of North American *B. burgdorferi* have revealed a major protein with the apparent molecular mass of OspC (29, 30). Included among the OspC-negative strains is B31, a widely distributed strain which is used as the source of test antigen in many clinical laboratories. Reasons for the variability in expression of OspC by these strains, which have been passaged for multiple generations *in vitro*, may be due to mutation, loss of the plasmid encoding the gene, or another as yet undefined mechanism(s) which is sensitive to varying growth conditions (20, 23, 28). The high prevalence of OspC-negative, *in vitro*-passaged strains probably accounts for the heretofore unappreciated reactivity of serum samples from patients with early Lyme disease with OspC. Nevertheless, frequent reactivity against OspC observed in serum samples from infected patients clearly argues that disease-causing spirochetes express OspC and that it is a dominant target of the early humoral immune response.

We have cloned and expressed OspC as a fusion protein in *E. coli* (20). In a previous study, we tested the feasibility of using rOspC in an ELISA for detection of Lyme disease (20). We showed that 15 of 15 serum samples from patients with clinically suspected Lyme disease had positive immunoblots and were also strongly reactive with rOspC. We also found that 5 serum samples from patients with syphilis, 10 containing rheumatoid factor with a high titer, 5 from patients with Epstein-Barr virus infection, and 10 from patients with systemic lupus erythematosus with antinuclear antibodies with high titers were all negative for anti-rOspC.

On the basis of those results, we have now carried out studies on a large panel of serum samples obtained from patients with culture-positive EM as well as a control group including patients from an area where Lyme disease is not endemic and patients with severe periodontitis.

As shown in Table 5, there was a positive correlation between duration after EM onset and frequency of positive results, regardless of the assay used. For the entire group of Lyme disease serum samples, the sensitivities of the immunoblot, regardless of the criterion used for a positive result, and the rOspC ELISA were equivalent (approximately 65%) and slightly better than that of the WC ELISA (58%) (Table 6). The specificities of all three tests, including the immunoblot with the criterion of three or more bands with or without the 23-kDa band, were 100% or nearly so (Table 6).

It is important to recognize that the source of antigen for the immunoblot and WC ELISA was strain 2591, a producer of abundant levels of OspC. Use of this strain may, therefore,

have led to increased sensitivities with these assays compared with the use of a nonexpressing strain. We have observed poorer test performance when directly comparing B31 (OspC-negative) and 2591-based assays (data not shown).

There were a number of serum samples in which there was a discrepancy between the observed reactivity to the 23-kDa protein by immunoblot and the rOspC ELISA. In most of these cases, including the negative controls from Iceland, there was faint reactivity found by immunoblot and negative reactivity by rOspC ELISA. This finding highlights the potential confusion introduced by subjective interpretation of intensity and apparent molecular size of a band on an immunoblot. Explanation of the less frequent situation of reactivity to rOspC and no band seen on the immunoblot (e.g., patient 6) is more difficult. Although strain 2591 served as the source of both the antigen used for the immunoblots and the gene used for expression of rOspC, there may be some differences in the expressed epitopes. For example, the rOspC is expressed as a fusion protein and coexpression of the glutathione S-transferase may influence the availability of immunoreactive sites. In addition, there is evidence that OspC is a lipoprotein in its native form, whereas rOspC likely lacks posttranslational modification (6, 12). Immunoblotting of serum samples with the rOspC preparation has not revealed reactivity with a contaminating protein derived from *E. coli* (data not shown).

Another consideration in this study was whether the rOspC from strain 2591, originally isolated in Connecticut, would be a useful target for testing serum samples from patients who are infected outside of that area. In this study, all of the Lyme disease samples tested were obtained from patients who contracted their infection outside of Connecticut. Despite this, the disease serum samples did demonstrate frequent and strong reactivity with the strain 2591 rOspC, suggesting there are common OspC antigenic epitopes shared by *B. burgdorferi* from different geographic sources. Also, we have recently found that antibodies in patients' sera are frequently directed against the carboxyl terminus of OspC, a conserved region of the protein among different strains of *B. burgdorferi* (data not shown).

The results of this study suggest that the use of rOspC in an ELISA is a convenient, readily automated, and easily standardized test for the serodiagnosis of early Lyme disease. The rOspC assay compared favorably in sensitivity and specificity to the much more difficult and labor-intensive immunoblot using a lysate of a strain which produces abundant levels of OspC.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Public Health Service grant R29-AR39361 (S.J.P.) and an Apollo Kingsley award from Connecticut Innovations, Inc., Department of Economic Development, State of Connecticut.

We thank Frank Nichols for providing the serum samples from patients with periodontitis.

#### REFERENCES

1. Aguero-Rosenfeld, M. E., J. Nowakowski, D. F. McKenna, C. A. Carbonaro, and G. P. Wormser. 1993. Serodiagnosis in early Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 31:3090-3095.
2. Anderson, J. F., L. A. Magnarelli, W. Burgdorfer, and A. G. Barbour. 1983. Spirochetes in *Ixodes dammini* and mammals from Connecticut. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32:818-824.
3. Barbour, A. G. 1984. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J. Biol. Med.* 57:521-525.
4. Benach, J. L., E. M. Bosler, J. P. Hanrahan, J. L. Coleman, G. S. Habicht, T. F. Bast, D. J. Cameron, J. L. Ziegler, A. G. Barbour, W. Burgdorfer, R. Edelman, and R. A. Kaslow. 1983. Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. *N.*



- Engl. J. Med. 308:740-742.
5. Berland, R., E. Fikrig, D. Rahn, J. Hurdin, and R. A. Flavell. 1991. Molecular characterization of the humoral response to the 41-kilodalton flagellar antigen of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *Infect. Immun.* 59:3531-3535.
  6. Brandt, M. E., B. S. Riley, J. D. Rudolf, and M. V. Norgard. 1990. Immunogenic integral membrane proteins of *Borrelia burgdorferi* are lipoproteins. *Infect. Immun.* 58:983-991.
  7. Burgdorfer, W., A. G. Barbour, S. F. Hayes, J. L. Benach, E. Grunwaldt, and J. P. Davis. 1982. Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? *Science* 216:1317-1319.
  8. Coleman, J. L., and J. L. Benach. 1987. Isolation of antigenic components from the Lyme disease spirochete: their role in early diagnosis. *J. Infect. Dis.* 155:756-765.
  9. Craft, J. E., D. K. Fischer, G. T. Shimamoto, and A. C. Steere. 1986. Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme disease. Appearance of a new immunoglobulin M response and expansion of the immunoglobulin G response late in the illness. *J. Clin. Invest.* 78:934-939.
  10. Dias, F., R. W. Ryan, and H. M. Feder. 1992. Interpretation of IgM western immunoblot banding patterns in patients suspected of having early Lyme disease. *abstr. A100*, p. 19. Program Abstr. V Int. Conf. Lyme Borreliosis, Arlington, Va.
  11. Dressler, F., J. A. Whalen, B. N. Reinhardt, and A. C. Steere. 1993. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J. Infect. Dis.* 167:392-400.
  12. Fuchs, R., S. Jauris, F. Lottspeich, V. Praec-Mursic, B. Wilske, and E. Soutschek. 1992. Molecular analysis and expression of a *Borrelia burgdorferi* gene encoding a 22kDa protein (pC) in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 6:503-509.
  13. Grodzicki, R. L., and A. C. Steere. 1988. Comparison of immunoblotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay using different antigen preparations for diagnosing early Lyme disease. *J. Infect. Dis.* 157:790-797.
  14. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227:680-685.
  15. Luger, S. W., and E. Krauss. 1990. Serologic tests for Lyme disease—interlaboratory variability. *Arch. Intern. Med.* 150:761-763.
  16. Magnarelli, L. A., and J. F. Anderson. 1988. Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of class-specific immunoglobulins to *Borrelia burgdorferi*. *Am. J. Epidemiol.* 127:818-825.
  17. Magnarelli, L. A., E. Fikrig, R. Berliand, J. F. Anderson, and R. A. Flavell. 1992. Comparison of whole-cell antibodies and an antigenic flagellar epitope of *Borrelia burgdorferi* in serologic tests for diagnosis of Lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* 30:3158-3162.
  18. Magnarelli, L. A., J. M. Meegan, J. F. Anderson, and W. A. Chappell. 1984. Comparison of an indirect fluorescent-antibody test with an enzyme-linked immunosorbent assay for serologic studies of Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 20:181-184.
  19. Magnarelli, L. A., J. N. Miller, J. F. Anderson, and G. R. Riviere. 1990. Cross-reactivity of nonspecific treponemal antibody in serologic tests for Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 28:1276-1279.
  20. Padula, S. J., A. Sampieri, F. Dias, A. Szezepanski, and R. W. Ryan. 1993. Molecular characterization and expression of p23 (OspC) from a North American strain of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 61:5097-5105.
  21. Robinson, J. M., T. J. Pilot-Matias, S. D. Pratt, C. B. Patel, T. S. Revirt, and J. C. Hunt. 1993. Analysis of the humoral response to the flagellin protein of *Borrelia burgdorferi*: cloning of regions capable of differentiating Lyme disease from syphilis. *J. Clin. Microbiol.* 31:629-635.
  22. Russell, H., J. S. Sampson, G. P. Schmid, H. W. Wilkinson, and B. Plikaytis. 1984. Enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay for Lyme disease. *J. Infect. Dis.* 149:465-470.
  23. Sadziene, A., B. Wilske, M. S. Ferdows, and A. G. Barbour. 1993. The cryptic *ospC* gene of *Borrelia burgdorferi* B31 is located on a circular plasmid. *Infect. Immun.* 61:2192-2195.
  24. Shrestha, M., R. L. Grodzicki, and A. C. Steere. 1985. Diagnosing early Lyme disease. *Am. J. Med.* 78:235-240.
  25. Steere, A. C. 1989. Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* 321:586-596.
  26. Steere, A. C., R. L. Grodzicki, A. N. Kornblatt, J. E. Craft, A. G. Barbour, W. Burgdorfer, G. P. Schmid, E. Johnson, and S. L. Malawista. 1983. The spirochetal etiology of Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* 308:733-740.
  27. Steere, A. C., G. J. Hutchinson, D. W. Rahn, L. H. Sigal, J. E. Craft, E. T. DeSanna, and S. E. Malawista. 1983. Treatment of the early manifestations of Lyme disease. *Ann. Intern. Med.* 99:22-26.
  28. Wilske, B., V. Praec-Mursic, S. Jauris, A. Hofmann, J. Pradel, E. Soutschek, E. Schwab, G. Will, and G. Wanner. 1993. Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 61:2182-2191.
  29. Wilske, B., V. Praec-Mursic, G. Schierz, and V. Busch. 1983. Immunochemical and immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains. *Zentralbl. Bakteriol. Hyg. A* 263:92-102.
  30. Wilske, B., V. Praec-Mursic, G. Schierz, R. Kuhbeck, A. G. Barbour, and M. Kramer. 1988. Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 539:126-143.

FALLA DE ORIGEN

11. Sandvig K, Garred O, Prydz K, et al. Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature* 1992; 358:510-2.
12. Orci L, Tagaya M, Amherdt M, et al. Brefeldin A, a drug that blocks secretion, prevents the assembly of non-clathrin-coated buds on Golgi cisternae. *Cell* 1991;64:1183-95.
13. Donta ST, Beristain S, Tomicic TK. Inhibition of heat-labile cholera and *Escherichia coli* enterotoxins by brefeldin A. *Infect Immun* 1993;61:3282-6.
14. Donohue-Rolfe A, Keusch GT, Edson C, Thorley-Lawson D, Jacewicz M. Pathogenesis of shigella diarrhea: IX. Simplified high yield purification of shigella toxin and characterization of subunit composition and function by the use of subunit-specific monoclonal and polyclonal antibodies. *J Exp Med* 1984;160:1767-81.
15. Seidah NG, Donohue-Rolfe A, Lazure C, Auclair F, Keusch GT, Chretien M. Complete amino acid sequence of shigella toxin B-chain: a novel polypeptide containing 69 amino acids and one disulfide bridge. *J Biol Chem* 1986;261:13928-31.

## Recombinant Outer Surface Protein C ELISA for the Diagnosis of Early Lyme Disease

Michael A. Gerber, Eugene D. Shapiro,  
Gillian L. Bell, Alicia Sampieri,  
and Steven J. Padula

Departments of Pediatrics and Medicine, University of Connecticut Health Center, Farmington; Department of Pediatrics, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut

To compare the sensitivity of a new ELISA for IgM antibodies to *Borrelia burgdorferi* that uses a recombinant outer surface protein C (rOspC) with those of a whole cell (WC) ELISA and an immunoblot assay for the diagnosis of early Lyme disease, serum specimens from 82 consecutive patients with physician-documented erythema migrans were analyzed. To compare the specificities of the three assays, serum specimens from 50 patients without a history of Lyme disease and from an area in which *B. burgdorferi* is not endemic were analyzed. The sensitivities of the WC ELISA, immunoblot assay, and IgM rOspC ELISA were 28%, 29%, and 46%, respectively, while the specificities were 100%, 100%, and 98%, respectively. The IgM rOspC ELISA is a convenient, readily automated, easily standardized serologic test that is significantly more sensitive for the diagnosis of early Lyme disease than either WC ELISA or immunoblot assay.

Because of the difficulty of either culturing *Borrelia burgdorferi* from patients' specimens or visualizing the organism in tissue specimens with either silver or immunohistochemical stains, laboratory confirmation of a *B. burgdorferi* infection is usually dependent on the demonstration of a specific immune response by the host [1]. However, serologic testing for Lyme disease is poorly standardized, and both false-negative and -positive results have been a considerable problem [2]. Low sensitivity has been a problem particularly with early-stage disease, because IgM antibodies may not be detectable by ELISA or immunoblot assays until 2-4 weeks after the onset of the infection, and IgG antibodies may not

be detectable for 6-8 weeks [3]. Arriving at a prompt and accurate diagnosis of early Lyme disease is clinically important because appropriate antibiotic therapy at this stage can prevent progression to involvement of the nervous or musculoskeletal systems.

Using immunoblots of lysates from *B. burgdorferi* 2591, we found the predominant early IgM response in sera from patients with early Lyme disease was to a 23-kDa protein [4]. After cloning and sequencing the gene encoding this protein, it was found to be identical to the outer surface protein C (OspC) [4]. Recombinant (r)OspC was expressed as a fusion protein in *Escherichia coli*, and in a preliminary investigation, serum specimens from patients with early Lyme disease were shown to react with this rOspC in an ELISA [4].

In the present study, we compared the sensitivity of this IgM rOspC ELISA with a whole cell (WC) ELISA and with an immunoblot assay (Western blot) in the diagnosis of early Lyme disease.

### Materials and Methods

Serum specimens were collected from children diagnosed between May 1992 and May 1994 with a solitary erythema migrans at one of five pediatric offices in southeastern Connecticut. All pediatricians in these offices are experienced in the diagnosis of Lyme disease. Controls were a group of children from whom serum specimens had been collected between No-

Received 13 June 1994; revised 4 October 1994.

Presented in part: 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, October 1994, Orlando, Florida.

Informed consent was obtained from patients or their parents, and the human experimentation guidelines of the US Department of Health and Human Services, University of Connecticut Health Center, and Yale University School of Medicine were followed.

Financial support: Public Health Service (AR-39361 to S.J.P.), Apollo Kingsley award from Connecticut Innovations, Inc., Department of Economic Development, State of Connecticut (to S.J.P.), and departmental funds.

Reprints or correspondence: Dr. Michael A. Gerber, Dept. of Pediatrics, University of Connecticut Health Center, Farmington, CT 06030-1515.

The Journal of Infectious Diseases 1995;171:724-7  
© 1995 by The University of Chicago. All rights reserved.  
0022-1899/95/7103-0035\$01.00

ember 1984 and May 1986 at a pediatric office in Danbury, Connecticut, as part of an earlier investigation of streptococcal pharyngitis [5]. None of these children had a history of Lyme disease, and Lyme disease was not endemic in the Danbury area at the time the sera were obtained. All sera were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until analysis. Each specimen was analyzed for the presence of IgM antibodies to *B. burgdorferi* using rOspC ELISA, WC ELISA, and immunoblot assay.

The test antigen used in the IgM rOspC ELISA was an rOspC fusion protein that was cloned from *B. burgdorferi* 2591. This strain was originally isolated from a white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*) caught in East Haddam, Connecticut, and was obtained from the Connecticut Agricultural Experiment Station (New Haven). The spirochetes were grown in BSK II medium in a closed flask at  $33^{\circ}\text{C}$  for 10–14 days, and the gene encoding OspC was cloned as previously described [4]. The rOspC was then expressed as a fusion protein with glutathione S-transferase at the amino terminus to facilitate its purification from *E. coli* proteins [4]. Glutathione S-transferase was also expressed and purified in exactly the same fashion as the fusion protein for use as a control in the ELISA.

The ELISA to detect IgM antibodies to this rOspC was then done as previously described [6]. Briefly, preliminary checkerboard titration studies with serum specimens containing IgM antibodies to native OspC by immunoblot assay were used to determine the optimal concentration of the rOspC fusion protein, which was 300 ng/well. Sixty microliters of the rOspC fusion protein (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in Dulbecco's PBS (DPBS) was added to alternate wells of the microtiter plate, which was then incubated for 12 h at  $4^{\circ}\text{C}$ . An equimolar amount of glutathione S-transferase in DPBS was added as a control antigen to the remaining wells. Serum specimens serially diluted twofold from 1:40 to 1:1280 in DPBS–0.05% Tween 20 were then added. The secondary antibody used was goat anti-human IgM ( $\mu$  chain specific) conjugated to peroxidase (Sigma, St. Louis) diluted in DPBS–0.05% Tween 20. Sixty microliters of chromogen substrate (equal volumes of 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate] and hydrogen peroxide; Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, MD) was added to each well.

Plates were read in a microplate spectrophotometer when the net absorbance value (optical density of a well with fusion protein minus that of a well with glutathione S-transferase) of the 1:160 dilution of the positive control was 0.5. A serum dilution was considered positive if the net absorbance was  $\geq 3$  SD above the mean net absorbance of the negative control wells as previously described [6].

WC ELISA, using a suspension of *B. burgdorferi* 2591 to detect IgM antibodies, was performed and interpreted as previously described [7]. The IgM immunoblot assay, using a sonicate of the same strain, was also done as previously described [8] and interpreted using recently proposed criteria [9].

The sensitivities and specificities of the three serologic assays were compared by using the  $\chi^2$  test.

## Results

In total, 82 consecutive patients with a solitary erythema migrans were enrolled. These patients were 1–18 years old (median, 6; mean, 8). Serum specimens were collected 0–30

days (median, 2) after the erythema migrans was first noticed. Of these 82 patients, 23 (28%) had a positive WC ELISA for IgM antibodies to *B. burgdorferi*, 24 (29%) had a positive immunoblot assay for IgM antibodies with at least 2 of 8 specific bands present, and 38 (46%) had a positive rOspC ELISA for IgM antibodies. The IgM rOspC ELISA was significantly more sensitive than the WC ELISA ( $P = .02$ ) and the immunoblot assay ( $P = .02$ ). There were 54 patients who had both a negative WC ELISA and a negative immunoblot assay for IgM antibodies to *B. burgdorferi*; 11 (22%) of these patients had a positive rOspC ELISA for IgM antibodies to *B. burgdorferi* and all 11 had only a 23-kDa band on immunoblot assays. Twenty-eight patients had either a positive WC ELISA or positive immunoblot assay; only 1 of these patients (4%) had a negative IgM rOspC ELISA (figure 1).

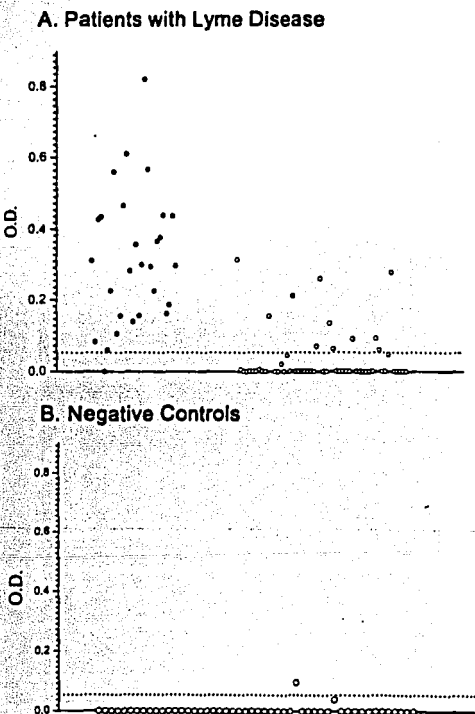


Figure 1. Net absorbance values expressed as optical density (OD) on IgM recombinant (r)OspC ELISA for patients with Lyme disease (A) and negative controls (B). Patients with positive IgM whole cell ELISA or IgM immunoblot (●); patients with neither positive IgM whole cell ELISA nor IgM immunoblot (○). Dotted line represents cutoff for positive IgM rOspC ELISA.

The 50 patients who served as negative controls were 3–17 years old (median, 9; mean, 9). None of the controls had either a positive WC ELISA or immunoblot assay for IgM antibodies to *B. burgdorferi*; 1 (2%) had a positive IgM rOspC ELISA (figure 1). There were no significant differences in the specificities of WC ELISA, immunoblot assay, and IgM rOspC ELISA (100%, 100%, and 98%, respectively). The 1 negative control with a positive IgM rOspC ELISA had only a 23-kDa band on immunoblot assay; none of the other negative controls had a 23-kDa band.

## Discussion

The results of this investigation suggest that the IgM rOspC ELISA is significantly more sensitive than immunoblot assay or WC ELISA in the diagnosis of early Lyme disease. The IgM rOspC ELISA has a number of advantages over the immunoblot assay: It is easier to perform, it is less labor intensive, it is easier to standardize, it is readily automated, and the interpretation of its results is much more objective. In addition, clinical trials are underway with two OspA vaccines, and patients who have received either of these would, if successfully immunized, have a positive WC ELISA but a negative IgM rOspC ELISA. Therefore, an additional advantage of the IgM rOspC ELISA over WC ELISA is that it could distinguish an actual infection with *B. burgdorferi* from an immune response to the OspA vaccine.

If a patient who either lives in or has recently visited an area where Lyme disease is endemic has the characteristic rash of this disease, erythema migrans, a clinical diagnosis of Lyme disease can easily be made and no further diagnostic evaluation is required [1]. However, in the absence of erythema migrans recognized by an experienced observer in an area where Lyme disease is endemic, laboratory evidence of a recent *B. burgdorferi* infection is required to confirm the diagnosis of early Lyme disease [1].

If a skin lesion is present but there is uncertainty about whether it is erythema migrans, an attempt can be made to culture *B. burgdorferi* from the lesion. Specimens for culturing have included skin biopsies and aspirates from cutaneous lavage [10]. The major problems with these procedures are the 2–11 weeks of incubation required for the *B. burgdorferi* to grow and their invasive nature. Recently, the polymerase chain reaction (PCR) assay has been used to detect *B. burgdorferi* DNA in various clinical specimens, including skin biopsies [11]. While the results of PCR are available much sooner (~2 days) than those of culture, PCR is expensive and technically complex, with a considerable number of false positives and negatives, and it is still an experimental procedure for the diagnosis of Lyme disease [11].

Therefore, laboratory confirmation of early Lyme disease is primarily dependent on serologic tests. One of the major problems with serologic tests for Lyme disease has been their relative insensitivity in patients with early-stage disease [3].

Standard WC ELISA procedures have been modified in a variety of ways in an attempt to improve sensitivity. For example, an IgM capture technique has been developed, purified flagellar protein has been used as the target antigen, putative immune complexes have been dissociated, and recombinant forms of the 41-kDa flagellar protein have been used as the target antigen [1]. However, the incremental value of these modifications over the standard WC ELISA has not been confirmed, and none is widely available.

Immunoblotting has also been used to detect serum antibodies to *B. burgdorferi*. Although some investigators have suggested that immunoblot may be more sensitive than ELISA in early Lyme disease, there is still debate about the proper interpretation of immunoblot results [8].

Early reports from North America suggested that the first detectable humoral response to *B. burgdorferi* by immunoblot assay was an IgM antibody to the 41-kDa flagellar protein [12]. However, flagellar protein sequences are conserved among many spirochetes, including the oral pathogens commonly found in periodontal disease, and therefore detection of antibodies to this protein is not specific for Lyme disease. Similar studies in Europe, using different strains of *B. burgdorferi* as the antigen, found IgM reactivity predominantly against a 21- to 22-kDa protein, which was designated pC [13]. Recently, we and others have described an early and dominant antibody response in patients with early Lyme disease that is directed against a protein of ~23 kDa [4, 9].

These early targets of the immune response have now both been determined to be OspC, a protein located in the outer membrane of *B. burgdorferi* [4, 14, 15]. Most lysates of North American strains of *B. burgdorferi*, including the widely distributed B31 (used as the source of target antigen in many clinical laboratories), do not express detectable levels of the OspC antigen [4, 14]. The reason(s) for the lack of expression of OspC by these strains, which have been passaged for multiple generations in vitro, is not clear. However, the frequent use of these OspC-negative strains as test antigens is probably why the IgM antibodies to OspC in serum specimens from patients with early Lyme disease were, heretofore, unappreciated.

The frequent reactivity against OspC observed in serum specimens from infected patients (when OspC-positive strains such as 2591 are used as the test antigen) clearly demonstrates that disease-producing strains of *B. burgdorferi* express OspC and that OspC is a dominant target of the early humoral immune response. We have previously demonstrated in 74 adults with culture-positive erythema migrans that, when *B. burgdorferi* 2591 (a producer of abundant OspC) is used as the source of test antigen, IgM rOspC ELISA is as sensitive and specific as immunoblot or WC ELISA in identifying IgM antibodies [6]. The sensitivities and specificities of IgM rOspC ELISA, immunoblot, and WC ELISA were 64% and 100%, 68% and 97%, and 58% and 100%, respectively [6].

The sensitivity of the immunoblot assays in our study could have been increased if the criteria used to interpret them had been modified. For example, if the presence of a single 23-kDa band had been considered a positive result, the sensitivity of the immunoblot would have been comparable to that of the IgM rOspC ELISA. In this study, in which all of the patients were children, defining a positive immunoblot as the presence of a single 23-kDa band did not lower the specificity of that test. However, in our earlier investigation, in which the patients were adults, defining a positive immunoblot as the presence of a single 23-kDa band would have reduced the specificity of that test to an unacceptably low level [6].

Because the test antigen in the current investigation was derived from *B. burgdorferi* 2591, which was originally isolated in Connecticut, and because all of the serum specimens came from patients living in Connecticut, the usefulness of the IgM rOspC ELISA outside of this area could be questioned. However, in our earlier study, the sera tested were obtained from patients who had contracted their infections outside of Connecticut and still demonstrated frequent and strong reactivity with rOspC derived from strain 2591 [6]. This suggests that there are common OspC epitopes shared by different strains of *B. burgdorferi* isolated from different locations. In addition, we have recently found that serum antibodies are frequently directed against the carboxy-terminus of OspC, a region of the protein that is conserved among different strains of *B. burgdorferi* (unpublished observations).

While it is important to validate the accuracy of IgM rOspC ELISA in a patient population with clearly defined early Lyme disease (i.e., those with erythema migrans), this is not the population in whom the use of the IgM rOspC ELISA would be most beneficial. The greatest benefit of this test would be in patients who do not have erythema migrans but present with various other clinical manifestations of early Lyme disease (e.g., influenza-like illness, aseptic meningitis, peripheral facial palsy). Additional investigations need to determine the sensitivity of IgM rOspC ELISA in such patients.

## References

- Gerber MA, Shapiro ED. Diagnosis of Lyme disease in children. *J Pediatr* 1992;121:157-62.
- Bakken LL, Case KL, Callister SM, Bourdeau NJ, Schell RF. Performance of 45 laboratories participating in a proficiency testing program for Lyme disease serology. *JAMA* 1992;268:891-5.
- Craft JE, Grodzicki RL, Steere AC. Antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnostic tests. *J Infect Dis* 1984;149:789-95.
- Padula SJ, Sampieri A, Dias F, Szczepanski A, Ryan RW. Molecular characterization and expression of p23 (OspC) from a North American strain of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 1993;61:5097-105.
- Gerber MA, Randolph MF, Chanatry J, Wright LL, Anderson LR, Kaplan EL. Once daily therapy for streptococcal pharyngitis with cefadroxil. *J Pediatr* 1986;109:531-7.
- Padula SJ, Dias F, Sampieri A, Craven RB, Ryan RW. Use of recombinant OspC from *Borrelia burgdorferi* for serodiagnosis of early Lyme disease. *J Clin Microbiol* 1994;32:1733-8.
- Magnarelli LA, Anderson JF. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of class-specific immunoglobulins to *Borrelia burgdorferi*. *Am J Epidemiol* 1988;127:818-25.
- Grodzicki RL, Steere AC. 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.
- Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J Infect Dis* 1993;167:392-400.
- Wormser GP, Forrester G, Cooper D, et al. Use of a novel technique of cutaneous lavage for diagnosis of Lyme disease associated with erythema migrans. *JAMA* 1992;268:1311-3.
- Sigal LH. The polymerase chain reaction assay for *Borrelia burgdorferi* in the diagnosis of Lyme disease. *Ann Intern Med* 1994;120:520-1.
- Barbour AG, Hayes SF, Heiland RA, Schrupf ME, Tessler SL. A *Borrelia*-specific monoclonal antibody binds to a flagellar epitope. *Infect Immun* 1986;52:549-54.
- Wilks B, Preac-Mursic V, Schierz G, Kuhbeck R, Barbour AG, Kramer M. Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. *Ann NY Acad Sci* 1988;539:126-43.
- Wilks B, Preac-Mursic V, Jauris S, et al. Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 1993;61:2182-91.
- Fuchs R, Jauris S, Lottspeich F, Preac-Mursic V, et al. Molecular analysis and expression of a *Borrelia burgdorferi* gene encoding a 22 kDa protein (pC) in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1992;6:303-9.