

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC 87-2313-B-002-085

執行期限：86 年 8 月 1 日至 87 年 7 月 31 日

主持人：潘銘正 執行機構及單位名稱：國立台灣大學獸醫學系

Email:vmipan@ccms.ntu.edu.tw

題目：以基因限制酶伯氏疏螺旋體分離株基因種之快速鑑定 (Rapid Screening and Assessing the Genetic Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains)

一、中文摘要

目前已知伯氏疏螺旋體分離株可分為 *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. japonica*, *B. andersonii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* 等 7 個基因種及未定的 DN127 群 (*B. bissettii*)。本計畫為了證實以 *rpoD* 基因內之內部分歧序列區域可做為區分伯氏疏螺旋體基因種之依據，一年內共收集了 19 株日本、歐洲及台灣伯氏疏螺旋體分離株進行增幅，經限制酶 *HindIII* 與 *RsaI* 分析後發現內部分歧序列區域在切割後主要呈現分別代表 *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. japonica*, 及 *B. lusitaniae* 等 4 基因種圖譜。其中 *B. afzelii*, *B. andersonii* 及 DN127 群 (*B. bissettii*) 無法完全區分，必須同時使用其他方法來輔助鑑定。此結果顯示 *rpoD* 基因之內部分歧序列區域適合作為伯氏疏螺旋體的快速分型工具。

關鍵詞：*rpoD* 基因、伯氏疏螺旋體、分型

Abstract

The causative agent of Lyme borreliosis, *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato, is currently classified as seven genospecies and an unclassified DN127 group (*B. bissettii*). The seven genospecies are *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. japonica*, *B. andersonii*, *B. valaisiana*, *B.*

lusitaniae. A total of nineteen strains (including Taiwan isolates) were collected and analyzed. On the basis of the results obtained after cleavage by *HindIII* and *RsaI* separately, it showed that the internal divergent region revealed four patterns, each representing one of the four genospecies, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. japonica*, and *B. lusitaniae*. However, strains belonging to *B. afzelii*, *B. andersonii* and DN127 (*B. bissettii*) cannot be differentiated by this method alone. The polymorphism of their *rpoD* gene in non-conserved region is therefore proven to be an alternative rapid way screening and assessing their diversity.

Key word: Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*, *rpoD* gene.

二、緣由與目的

萊姆病 (Lyme disease) 是由伯氏疏螺旋體 (*Borrelia burgdorferi* sensu lato) 所引起的人畜共通之全身性多系統疾病，其傳染媒介為硬蜱壁蝨 (*Ixodes*) [7, 35]。本病通常會以典型的皮膚症狀 - 移行性紅斑 (erythema migrans) 為開端，如果不加以治療，症狀會擴及他處，除了皮膚症狀外，尚會出現關節炎以及神經與心臟方面的症狀[25]。目前依照 DNA 雜交與 rRNA 之限制酶圖譜，可將伯氏疏螺旋體分成 8 種基因種 (genospecies)，分別為 *B. burgdorferi* sensu stricto、*B. afzelii*、*B. garinii*、*B. japonica*、*B. andersonii*、*B. valaisiana*、*B. lusitania* [1,8,9,12,19,31] 以及新命名的 *B. bissettii* (原 DN127 群) [20]。許多證據顯示，這些基因種所分布的地理區域與各地

所觀察到不同的臨床表徵有著密切的關聯 [29, 35]，其中 *B. burgdorferi sensu stricto* 主要引起之症狀為關節炎，此基因種大部分出現在美國，歐洲則少有蹤跡，至於 *B. garinii* 與 *B. afzelii* 兩者皆分布於歐亞地區，被認為是引起 neuroborreliosis 和慢性萎縮性四肢皮炎 (acrodermatitis chronica atrophicans) 的元兇[2]。

由於伯氏疏螺旋體分離株之異質性 (heterogeneity)，許多的分型方法，諸如質體分析 (plasmid analysis) [34]、血清分型 (serotyping) [32,33,34,35]、脈衝電場電泳[4]、hbb 基因序列[28]、聚合酶鏈反應 - 限制酶片段多形性 (PCR-RFLP) [10,14] 等，皆已被應用來分型與研究分離株間之分歧。在眾多的方法中，rRNA 基因由於其序列呈高度的保留特性，同時又為細菌的必需基因，因此常被利用做為分型的工具 [15,18,21]；而 *rpoD* 基因也具有類似的特性，其產物為 primary sigma factor，屬管家基因，為細菌的必需基因[6,11]。而 sigma factor 為 RNA polymerase 的次單位之一，可和 core enzyme 結合形成全酶 (holoenzyme)，且特異性辨識結合基因之啟動子 (promoter) 區域而起始轉錄作用，在轉錄起始作用方面扮演極其關鍵的角色[8]。sigma factor 經序列比對後可分成 4 個保留區 (region 1~4) 與 1 個內部分歧序列區域 (internal divergent sequence)，這些保留區序列在細菌中呈高度保留，而內部分歧序列區域則只存在於革蘭氏陰性菌中[5,10,28]。由於 *rpoD* 基因為細菌的必需基因，而且序列保留度又高，因此值得加以探討將其運用於分型的可能。本實驗目的即在於嘗試利用 *rpoD* 基因的聚合酶鏈反應 - 限制酶片段多形性來對伯氏疏螺旋體分離株進行分型，期望能達到與伯氏疏螺旋體基因種一致的結果。

三、結果與討論

一、內部分歧序列區域之聚合酶鏈反應 - 限制酶片段多形性結果

以 YLKE 及 RCTW 2 個引子來進行聚

合酶鏈反應，煉合溫度皆為 55℃，13 株的伯氏疏螺旋體分離株皆增幅出相同大小的產物，長度約是 872 bp，與預期的長度相同。

將聚合酶鏈反應增幅所得產物直接以限制酶切割，先後嚐試了 *EcoRI*、*BglII*、*HincII*、*PstI*、*BamHI*、*HindIII*、*SphI*、*HaeIII* 及 *RsaI* 等 9 種限制酶，其中 *EcoRI*、*BglII*、*HincII*、*PstI* 及 *BamHI* 無法對所有分離株的聚合酶鏈產物產生切割，而其餘 4 種限制酶則可對部分分離株作用產生限制酶圖譜：

HaeIII - 除 *B. afzelii* 的 3 株分離株不產生切割外，有 9 株分離株皆產生同一圖譜，並皆出現 2 個片段 (約 559 bp, 313 bp)，而 HT2 分離株則產生 3 個片段，呈現一個獨特的圖譜。

SphI - 除 *B. afzelii* 的 3 株分離株不產生切割外，其餘 10 株分離株皆被切割成 2 個片段 (約 681 bp, 291 bp)。

HindIII - 只對 2 株 *B. burgdorferi sensu stricto* 作用，產生 2 個片段 (約 527 bp, 345 bp)，而其餘屬於其他基因種之 11 株分離株則不產生切割。

RsaI - 所有 *B. burgdorferi sensu stricto* 與 *B. afzelii* 的分離株共 5 株，皆不產生切割片段，而 4 株 *B. garinii* 與 3 株尚未劃分基因種的分離株則產生相同的限制酶圖譜，呈現 2 個片段，至於 *B. japonica* 分離株 IKA₂ 雖也產生 2 個片段的限制酶圖譜，但自成一獨特的圖譜。

綜合上述的限制酶片段多形性的結果，我們發現，合併 *HindIII* 與 *RsaI* 2 個限制酶片段多形性的結果，共可歸納出 4 群主要的圖譜，在此稱之為圖譜 I、II、III、IV (圖 1)，而對照這些圖譜內的分離株以及各分離株所屬的基因種，可發現互相吻合，其中圖譜 I 相當於 *B. burgdorferi sensu*

stricto, 圖譜 II 相當於 *B. garinii*, 圖譜 III 則與 *B. japonica* 相當, 而圖譜 IV 則相當於 *B. afzelii*, 至於 3 株尚未分類的分離株則全部呈現圖譜 II (表 1)。

二、region 2.4~4.2 之聚合酶鏈反應 - 限制酶片段多形性結果

以 TW 及 ERC 2 個引子來進行聚合酶鏈反應, 13 株的伯氏疏螺旋體在不同的煉合 (anneal) 溫度下, 皆增幅出長度約 499 bp 的產物, 其中分離株 B31、VS461、P/Gau、Bfox 及 IKA₂ 的煉合溫度為 55 , 而 HT2、20047、IP90、K48、HT59、NP81 及 NT25 這 7 株分離株的煉合溫度則為 47 。

聚合酶鏈反應所得的產物, 經限制酶切割分析後, 發現 *Pst*I、*Hind*III、*Hinc*II 及 *Hae*III 4 種限制酶無法對任何 1 株之產物切割, 而以 *Rsa*I 切割則可以產生 3 個主要的切割圖譜 (圖譜 A, B, C), 圖譜 A 之分離株與 *B. burgdorferi sensu stricto* 相同, 圖譜 B 的分離株則與 *B. garinii* 相同, 至於 *B. afzelii* 及 *B. japonica* 的分離株皆是呈現圖譜 C; 但是 *B. garinii* 分離株 K48 和 1 株未分類的分離株 HT2 卻是各自呈現獨特的圖譜 (見表 1)。

回顧本實驗之過程, 為達快速分型目的, 直接以菌液加熱來進行聚合酶鏈反應, 結果證明效果良好; 而當進行聚合酶鏈反應時, 在增幅內部分歧區域序列的部分 (即引子 YLKE 與 RCTW), 可發現所有分離株煉合所需的溫度皆同為 55 , 但在進行 region 2.4~4.2 的增幅 (即引子 TW 與 RCTW) 時, 卻出現有 7 株分離株之煉合溫度需降到 47 才能增幅出產物, 顯示所設計的引子與這些分離株之序列有所差異, 值得注意的是, 這 7 株分離株中的 4 株全為 *B. garinii*, 而另 3 株則為未分類之分離株, 顯示其核苷酸序列似乎具有基因

種上的特異性。

rpoD 基因 4 個保留區域中以 region 2 與 region 4 的保留程度最高, 而 subregion 1.1 與介於 region 1 與 region 2 間的內部分歧序列區域的保留程度最低[11], 其中內部分歧序列區域只存在革蘭氏陰性菌中 [30], 被認為是細菌在演化過程中發生刪除或是插入所造成的, 在序列呈高度保留的 *rpoD* 基因上, 內部分歧序列區域似乎是不同細菌間差異最大的區域, 這個差異似乎可利用來分型。目前許多細菌的 *rpoD* 基因皆已被選殖定序出來, 而伯氏疏螺旋體的 *rpoD* 基因序列直到最近才被定序發表, 其 *rpoD* 基因亦同樣具有 4 個保留區域及 1 個內部分歧序列區域[27], 為評估利用此基因分型的可能性, 我們嚐試分別以內部分歧序列區域和 subregion 2.4~4.2 這兩段序列, 以聚合酶鏈反應 - 限制酶片段多形產的方法來對伯氏疏螺旋體分離株進行分型, 初步結果顯示, 內部分歧序列區域是一段適合利用來分型的序列; 至於 subregion 2.4~4.2 部分, 可能由於序列太過保留, 所以到目前為止只能暫時分出 3 種基因種, 而且其經限制酶切割後的片段太小, 不易由凝膠電泳分辨出來, 要將其應用於分型, 似乎較為困難。

由於伯氏疏螺旋體基因種的分布與各地萊姆病之症狀有著顯著的關聯[29], 因此快速且正確地對伯氏疏螺旋體分離株進行分型相當重要, 近年來許多相關研究即著力於此。核糖體核酸基因型別法 (ribotyping) 可順利區分出各基因種, 不過仍有一些不一樣的圖譜存在 [1,15,16,18,19,26,35], 而且此法較麻煩且費時。亦有學者將具基因種特異性的引子以聚合酶鏈反應進行分型[12], 但此方法只能應用於現有之基因種, 一旦出現新的基因種便無法分型, 而 Fukunaga 等人亦發現採

用此法時有些日本分離無法增幅出任何產物[5]。此外，利用其他基因進行限制酶片段多形性之研究也有麻煩、費時等缺點。Ralph 等人發展以 *ospA* 及 *ospB* 基因為基礎的聚合酶鏈反應 - 限制酶片段多形性之研究，效果也不錯，但日本分離株仍會出現不同圖譜[8]。而利用 rRNA 的 intergenic spacer 之聚合酶鏈反應 - 限制酶片段多形性雖可完全區分出所有基因種，但 *B. japonica* 之分離株 IKA2 卻連聚合酶鏈反應都增幅不出產物[19]；此外，Liveris 等人進行相似實驗時，則只能初步將伯氏疏螺旋體分成 2 型[10]。而本實驗所發展的方法，可於短時間內快速且正確地分型，但其對於伯氏疏螺旋體分型之實用性，則仍然需以更多的分離株進行測試。

事實上，在內部分歧序列區域的限制酶片段多形性圖譜中，無論將 *Hind* III、*Spl* I 及 *Rsa* I 三者 *Hind* III 及 *Rsa* I 兩者或是 *Spl* I 及 *Rsa* I 兩者之限制酶圖譜併在一起，皆可區分出 4 種基因種。而不論是根據內部分歧序列區域或 subregion 2.4~4.2 的聚合酶鏈反應 - 限制酶片段多形性的結果，皆把分離株 HT2、NT25 與 NP81 歸入 *B. garinii* 中，其中 HT2 在 Fukunaga 以 23S rRNA 做探針所進行之 ribotyping 實驗中，被歸為 ribotype IV[5]，而進行 *OspC* 序列比對時發現 ribotype IV 屬 *B. garinii*[35]，此結果與本實驗所得結果相符，綜合上述結果，顯示分離株 HT2、NT25 及 NP81 應是屬於 *B. garinii*。此外，許多報告皆指出 *B. garinii* 較具分歧[3]，在本實驗中也發現內部分歧序列區域以 *Hae* III 切割後，分離株 HT2 出現獨特圖譜，而 subregion 2.4~4.2 以 *Rsa* I 切割後，分離株 K48 與 HT2 亦各自出現不同圖譜（表 1），而這 2 株分離株皆為 *B. garinii*，顯示 *B. garinii* 之分歧度確實較大。

綜合以上所述，應用 *rpoD* 基因的內部分歧序列區域，可對伯氏疏螺旋體分離株進行快速且正確的分型，同時，根據本實驗之結果，分離株 HT2、NT25 及 NP81 應是屬於 *B. garinii*。*rpoD* 基因在本實驗成功地被運用於分型上，代表著此基因亦可能運用於其他細菌的分型，至於其分型效果，則有待更進一步的研究。

台灣分離株經初步分析係屬於 *B. burgdorferi sensu stricto* [22,23,24]。此結果和其他研究者的推斷極為懸殊[13,14,26]。

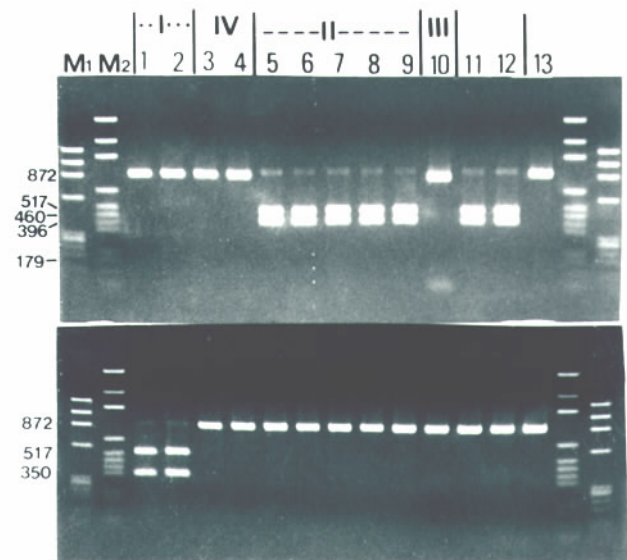


圖 1

四、計畫成果自評

本計畫執行第二年計畫已測試進一步收集的更多菌株尤其是 *B. japonica* 基因種。結果顯示以 *rpoD* 基因來做為本菌快速分型的構想相當可行。第一年結果已發表（Pan MJ et al. 1997. Sequence diversity of a gene encoding a putative primary sigma factor among *Borrelia burgdorferi sensu lato* strains. FEMS Microbiol Letters. 148: 153-

158.) [17]。很遺憾到目前為止我們還未分離到菌株，因此尚無法以本文所述方法加以驗證。

五、參考文獻

- [1] **Baranton, G., Postic, D., Saint Girons, I., Boerlin, P., Piffaretti, J.-C., Assous, M. and Grimont, P.A.D.** (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.
- [2] **Canica, M.M., Nato, F., du Merle, L., Mazie, J.C., Baranton, G. and Postic, D.** (1993) Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scand. J. Infect. Dis.* 25, 441-448.
- [3] **Dykhuisen, D.E., Polin, D.S., Dunn, J.J., Wilske, B., Preac-Mursic, V., Dattwyler, R.J. and Luft, B. J.** (1993) *Borrelia burgdorferi* is clonal: implication for taxonomy and vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 10163-10167.
- [4] **Foretz, M., Postic, D., and Baranton, G.** (1997) Phylogenetic analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by arbitrarily primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Syst Bacteriol.* 47(1):11-8
- [5] **Fukunaga, M., and Hamase, A.** (1995) Outer surface protein C gene sequence analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates from Japan. *J. Clin. Microbiol.* 33:2415-2420.
- [6] **Helmann, J.D. and Chamberlin, M.J.** (1988) Structure and function of bacterial sigma factors. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 839-872.
- [7] **Johnson, R.C., Schmid, G.P., Hyde, F.W., Steingerwalt, A.G. and Brenner, D.J.** (1984) *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34, 496-497.
- [8] **Kawabata, H., Masuzawa, T. and Yanagihara, Y.** (1993) Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol. Immunol.* 37, 843-848.
- [9] **Le Fleche, A., Postic, D., Girardet, K., Peter, O., and Baranton, G.** (1997) Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol.* 47(4):921-5
- [10] **Liveris D., Wormser G. P., Nowakowski, J., Nadelman, R., Bittker, S., Cooper, D., Varde, S., Moy, F. H., Forseter, G., Pavia, C. S., and Schwartz, I.** (1996) Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* from Lyme disease patients by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1306-1309.
- [11] **Lonetto, M., Gribskov, M. and Gross, C.A.** (1992). The γ family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J. Bacteriol.* 174, 3843-3849.
- [12] **Marconi, R.T., Liveris, D. and Schwartz, I.** (1995) Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: Phylogenetic analysis of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2427-2434.
- [13] **Marti Ras, N., Postic, D., Foretz, M., and Baranton, G.** (1997) *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, a bacterial species "made in the U.S.A."? *Int J Syst Bacteriol* 47(4):1112-1117.
- [14] **Masuzawa, T., Komikado, and Yanagihara, Y.** (1997) PCR-restriction fragment length polymorphism analysis

- of the *ospC* gene for detection of mixed culture and for epidemiological typing of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. Clin. and Diag. Lab. Immunol. 4(1):60-63.
- [15] **Masuzawa, T., Komikado, T., Iwaki, A., Suzuki, H., Kaneda, K. and Yanagihara, Y.** (1996) Characterization of *Borrelia* sp. isolated from *Ixodes tanuki*, *I. turdus*, and *I. columnae* in Japan by restriction fragment length polymorphism of *rrf* (5S)-*rrl* (23S) intergenic spacer amplicons. FEMS Microbiol. Lett. 142, 77-83.
- [16] **Nakao, M., Miyamoto, K., and Fukunaga, M.** (1994) Lyme disease spirochetes in Japan: enzootic transmission cycles in birds, rodents, and *Ixodes persulcatus* ticks. J. Inf. Dis. 170:878-882.
- [17] **Pan M.J., Tsai, C.P., Yeh, J.C.** (1997) Sequence diversity of a gene encoding a putative primary sigma factor among *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. FEMS Microbiol Letters. 148: 153-158.
- [18] **Postic, D., Assous, M. V., Grimont P. A. D. and Baranton G.** (1994). Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of *rrf*(5S) *rrl*(23S) intergenic spacer amplicons. Int J Syst Bacteriol. 44: 743-752.
- [19] **Postic, D., Belfaiza, J., Isogai, E., Saint Girons, I., Grimont, P.A.D. and Baranton, G.** (1993) A new genomic species in *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated from Japanese ticks. Res. Microbiol. 144, 467-473.
- [20] **Postic D., Ras, N.M., Lane, R.S., Henderson, M., and Baranton, G.** (1998) Expanded diversity among Californian borrelia isolates and description of *Borrelia bissetii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). Clin Microbiol. 36(12):3497-504.
- [21] **Sato, Y., Miyamoto, K., Iwaki, A., Masuzawa, T., Yanagihara, Y., Korenberg, E.I., Gorelova, N.B., Volkov, V.I., Ivanov, L.I., and Liberova, R.N.** (1996) Prevalence of Lyme disease spirochetes in *Ixodes persulcatus* and wild rodents in far eastern Russia. Appl. And Environ. Microbiol. 62(10):3887-3889.
- [22] **Shih C.M., Chang, H. M., Chen, S. L., and Chao, L.L.** (1998) Genospecies Identification and Characterization of Lyme Disease Spirochetes of Genospecies *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Isolated from Rodents in Taiwan. J. Clin. Microbiol. 36: 3127-3132.
- [23] **Shih C.M., Chao L.L.** (1998) Lyme disease in Taiwan: primary isolation of *Borrelia burgdorferi*-like spirochetes from rodents in the Taiwan area. Am J Trop Med Hyg. 59(5):687-92.
- [24] **Shih, C.M., Wang, J. C., Chao, L.L., and Wu, T.N.** (1998) Lyme disease in Taiwan: First human patient with characteristic erythema chronicum migrans skin lesion J. Clin. Microbiol. 36: 807-808.
- [25] **Steere, A.C.** (1989) Lyme disease. N Engl J Med 321(9):586-96.
- [26] **Takada, N., Ishiguro, F., Fujita, H., Wang, H. P., Wang, J. C., and Masuzawa, T.** (1998) Lyme disease spirochetes in ticks from northeastern China. J. Parasitol. 84(3):499-504.
- [27] **Tsai, C.P. and Pan, M.J.** (1996) Sequence of a gene encoding a putative primary sigma factor from *Borrelia burgdorferi* strain B31. Gene 168, 123-124.
- [28] **Valsangiacomo, C., Balmelli, T., and Piffaretti, J.C.** (1997) A phylogenetic analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato based on sequence information from the *hbb* gene, coding for a histone-like protein. Int J Syst Bacteriol. 47(1):1-10
- [29] **van Dam, A.P., Kuiper, H., Vos, K., Widjojokusumo, A., de Jongh, B.M., Spanjaard, L., Ramselaar, A.C., Kramer, M.D., and Dankert J.** (1993) Different genospecies of *Borrelia*

- burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. Clin Infect Dis. 17(4):708-17
- [30] **Versalovic, J., Koeth, T., Britton, R., Geszvain, K. and Lupski, J.R.** (1993) Conservation and evolution of the *rpsU-dnaG-rpoD* macromolecular synthesis operon in bacteria. Mol. Microbiol. 8, 343-355.
- [31] **Wang, G., van Dam, A.P., Le Fleche, A., Postic, D., Peter, O., Baranton, G., de Boer, R., Spanjaard, L., and Dankert, J.** (1997) Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). Int J Syst Bacteriol 47(4):926-32.
- [32] **Wilske, B., Jauris-Heipke, S., Lobentanzer, R., Pradel, I., Preac-Mursic, V., Rossler, D., Soutschek, E. and Johnson. R.C.** (1995) Phenotypic analysis of outer surface protein C (*OspC*) of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by monoclonal antibodies: relationship to genospecies and OspA serotype. J. Clin. Microbiol. 33, 103-109.
- [33] **Wilske, B., Preac-Mursic, V., Golbel, U.B., Graf, B., Jauris, S., Soutschek, E., Schwab, E. and Zumstein, G.** (1993) An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. J. Clin. Microbiol. 31, 340-350.
- [34] **Xu, Y., Johnson, R.C.** (1995) Analysis and comparison of plasmid profiles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. J Clin Microbiol. 33(10):2679-85
- [35] **Yanagihara, Y., and Masuzawa, T.** (1997) Lyme disease (Lyme borreliosis). FEMS Immunol and Med Microbiol. 18:249-261.

Table 1. PCR-RFLP patterns revealed by two intragenic regions of *rpoD* among *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains.

<i>B. burgdorferi</i> sensu lato		Internal divergent region			Subregion 2.4 - 4.2	
Genospecies	Strain	RFLP pattern	<i>Hind</i> III fragments (bp)	<i>Rsa</i> I fragments (bp)	RFLP pattern	<i>Rsa</i> I fragments (bp)
<i>B. burgdorferi</i> sensu strico	B31*	I	344, 528	-	A	-
	297vi*	I	344, 528	-	A	-
	CT20004	I	344, 528	-	A	-
	CT27985	I	344, 528	-	A	-
	JD1	I	344, 528	-	A	-
	N40	I	344, 528	-	A	-
	TB	I	344, 528	-	A	-
	VS219	I	344, 528	-	A	-
	ECM-NY86	I	344, 528	-	A	-
<i>B. andersonii</i>	21123	II	-	-	B	67, 432
Group DN127	DN127	II	-	-	B	67, 432
<i>B. afzelii</i>	VS461*	II	-	-	B	67,432
	P/Gau*	II	-	-	B	67, 432
	B fox*	II	-	-	B	67, 432
<i>B. garinii</i>	HT2*	III	-	400, 472	B	67, 432
	20047*	III	-	400, 472	C	17, 50, 432
	IP90*	III	-	400, 472	C	17, 50, 432
	NP81*	III	-	400, 472	C	17, 50, 432
	NT25*	III	-	400, 472	C	17, 50, 432
	HP1	III	-	400, 472	C	17, 50, 432
	HT19	III	-	400, 472	C	17, 50, 432
	NT24	III	-	400, 472	C	17, 50, 432
	NT31	III	-	400, 472	C	17, 50, 432
	HT59*	III	-	400, 472	D	17, 150, 332
	K48*	III	-	400, 472	E	17, 50, 146, 286
<i>B. japonica</i>	IKA2*	IV	-	53, 819	B	67, 432

} Restriction Fragment sizes for strains denoted with asterisk were determined from the sequences, others were estimated from result of electrophoresis.