

# 环介导恒温扩增对莱姆病病原 伯氏疏螺旋体的分型鉴定

杨吉飞 关贵全 牛庆丽 李有全 刘军龙 马米玲 任巧云 刘爱红 王子坚  
杨朝霞 罗建勋\* 殷宏\*

(中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室  
甘肃省动物寄生虫病重点实验室 甘肃 兰州 730046)

**摘要:** 使用环介导恒温扩增技术, 基于莱姆病病原伯氏疏螺旋体的外膜蛋白 A (*OspA*) 基因, 针对伯氏疏螺旋体不同的基因型设计特异性引物, 对国内主要的莱姆病病原伯氏疏螺旋体的 3 个基因型进行分型鉴定。研究表明, 设计的引物具有良好的特异性, 可以对狭义伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi sensu stricto*)、嘎氏疏螺旋体 (*B. afzelii*) 和伽氏疏螺旋体 (*B. garinii*) 进行分型鉴定。伯氏疏螺旋体的分型鉴定可以对不同临床症状莱姆病患者的治疗和莱姆病的控制提供一定的依据。

**关键词:** 环介导的恒温扩增, 伯氏疏螺旋体, 分型鉴定

## A Genotype Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) for *Borrelia Burgdorferi* of Lyme Disease

YANG Ji-Fei GUAN Gui-Quan NIU Qing-Li LI You-Quan LIU Jun-Long  
MA Mi-Ling REN Qiao-Yun LIU Ai-Hong WANG Zi-Jian  
YANG Zhao-Xia LUO Jian-Xun\* YIN Hong\*

(Key Laboratory of Veterinary Parasitology of Gansu Province, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730046, China)

**Abstract:** *Borrelia Burgdorferi* is the causative pathogens for Lyme disease. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) rapid assay was developed for genotyping *Borrelia borgdorferi* based on the outer surface protein A (*OspA*) gene. All three different genotypic isolates including *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* and *B. garinii*, distributed mainly in China were detected and genotyped successfully using the LAMP method. The genotyping of *Borrelia burgdorferi* would provide evidence for treatment of patients with different clinical symptoms and for control of Lyme disease.

**Keywords:** Loop-mediated isothermal amplification, *Borrelia burgdorferi*, Genotyping

基金项目: 国家支撑计划项目(No. 2007BAD40B02); 国家自然资源平台项目(No. 2005DKA21100); 国家自然科学基金项目(No. 30571397); 国家 863 计划项目(No. 2006AA10A207); 科技部欧盟项目专项经费项目(No. 245145); 中国农业科学院杰出人才基金、欧盟 EPI-ZONE、ICTD3 (INCO No. 510561); SSA-INCOME 项目(No. 211757)

\* 通讯作者: Tel: 86-931-8342515; E-mail: ttbdcn@public.lz.gs.cn

收稿日期: 2009-12-28; 接受日期: 2010-03-16

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

莱姆病(Lyme disease)是由伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)引起的一种由媒介蜱传播的自然疫源性人畜共患病, 该病损害人和动物的皮肤、神经、关节、心脏等多个器官和系统<sup>[1]</sup>。1982年Burgdorferi在美国的康涅狄格州莱姆镇首次从肩突硬蜱(*Ixodes scapularis*)中分离并证实莱姆病的病原<sup>[2]</sup>。我国于1986–1987年在黑龙江省海林县首次发现莱姆病并从全沟硬蜱中分离出病原, 证实了该病的存在。目前我国已经有30个省、市、自治区确定存在莱姆病的自然疫源地<sup>[3]</sup>。在美国, 莱姆病素有“第二艾滋病”之称, 自1982年以来, 美国疾病预防控制中心(CDC)至少有200000个莱姆病病例报告, 从1998–2001年, 每年大约有17000个病例报告, 2002年增长为23763个<sup>[4]</sup>。在我国, 近年来莱姆病每年新发病例高达2万余例, 而且发病率和发病人数呈上升趋势, 林区工人和农民是本病的高发人群<sup>[5]</sup>。

目前为止, 已分离鉴定的伯氏疏螺旋体至少可以分为13个基因型: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. japonica*, *B. andersonii*, *B. tanukii*, *B. turdae*, *B. bissettii*, *B. sinica*, *B. spielmanii*, 以及最近新发现的 *B. californiensis*<sup>[6–10]</sup>。这些基因型当中, 3个基因型(*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. andersonii*, *B. bissettii*)存在于北美; 5个基因型(*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*)存在于欧洲; 7个基因型(*B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. sinica*, *B. turdae*)存在于亚洲。我国至少存在伯氏疏螺旋体的3个基因型(*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*), 而且, 这3个基因型对人和动物具有致病性<sup>[11]</sup>。不同基因型的伯氏疏螺旋体感染人和动物所引起临床症状不同<sup>[12]</sup>。通过对伯氏疏螺旋体分离株分子流行病学的分析, 已经确定伯氏疏螺旋体的基因型与贮藏宿主动物、传播媒介蜱、患病动物和人的不同临床表现之间存在特定的关系<sup>[13]</sup>。因此, 对于莱姆病螺旋体的分型显得尤为重要。

到目前为止, 区分伯氏疏螺旋体基因型的方法主要有聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)、限制性片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)和反向线状印迹(Reverse line blot, RLB), 但是PCR、RFLP以及RLB在区分本病病原时需要复杂的系统, 费时费力, 对

操作实验要求较高, 需要专业的技术人员<sup>[14–16]</sup>。2000年, 日本科学家Notomi T等发明了一种敏感性很高的DNA扩增技术——环介导恒温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)<sup>[17]</sup>, 该方法操作简单, 只需要恒温水浴锅即可进行反应; 反应的特异性较高, 实验中设计的内、外2对引物识别靶序列上的6个独立区域; 所需反应时间较短, 一般30–60 min即可完成反应。根据LAMP反应的这些特点, 本实验应用该技术, 基于伯氏疏螺旋体的外膜蛋白A(Outer surface protein A, *OspA*)基因对莱姆病病原伯氏疏螺旋体进行基因分型鉴定。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要仪器:** 恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司)、凝胶成像仪(上海培清科技有限公司)、PCR仪(BIO-RAD)、暗视野显微镜(Olympus)。

**1.1.2 主要试剂:** Bst DNA聚合酶(NEB), 基因组提取试剂盒(Puregene DNA purification Kit, QIAGEN), 甜菜碱(Sigma), BSK II培养基(Sigma)。

**1.1.3 菌株及基因组:** 实验中包括国内主要流行的伯氏疏螺旋体的3个基因型菌株。狭义伯氏疏螺旋体(*B. burgdorferi sensu stricto*, *Bb*)和嘎氏疏螺旋体(*B. afzelii*, *Ba*)标准菌株购自美国菌种保藏中心(ATCC); 伽氏疏螺旋体(*B. garinii*, *Bg*)标准菌株由军科院流行病学研究所惠赠。衣原体(鹦鹉热衣原体)和支原体(丝状支原体山羊亚种)基因组由中国农业科学院兰州兽医研究所传染病研究室提供, 立克次氏体(羊无浆体、边缘无浆体)以及巴贝斯虫(莫氏巴贝斯虫、新疆巴贝斯虫未定种、牛巴贝斯虫、双芽巴贝斯虫)、泰勒虫(尤氏泰勒虫、吕氏泰勒虫)基因组由中国农业科学院兰州兽医研究所寄生虫病研究室提供。

**1.1.4 引物设计:** 针对伯氏疏螺旋体不同的基因型, 基于*OspA*基因, 根据DNASar软件序列分析的结果, 使用PrimerExploerV4软件(<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>)分别设计狭义伯氏疏螺旋体(*Bb*)、嘎氏疏螺旋体(*Ba*)和伽氏疏螺旋体(*Bg*)3个基因型菌株的LAMP特异性引物。引物序列由宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)合成, 引物序列见表1。

表 1 LAMP 特异性引物序列  
Table 1 Specific primer sequences for LAMP

名称 Name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
<i>Bb</i>	FIP gccgtcttggttttttcttgccttttcagcgttcagtagattgc BIP gtacacaagcttgagcttaaaggattttttgtcagcttttacgcctt F3 tagcagccttgacgagaa B3 ttgacctagatgcgcagaa
<i>Ba</i>	FIP catggttttgcagacaattcaccctttgttctaagacaaaacatcaacaga BIP atacagaaatgaaaagcgtggaacttttagctacttttccctcaagagt F3 gccaaaacattagtgtcaaga B3 ggttctctcttttactccaatg
<i>Bg</i>	FIP ccggttcacatgcctttttttctgttttgaataaacaataactaagagcaaacg BIP aagactttgctcttgaggaactttttgcttaaaacaacagtgcc F3 ttcaacgcaaaagtgat B3 caactgttatttctccagagt

## 1.2 方法

**1.2.1 菌株的培养:** 接种标准的狭义伯氏、嘎氏和伽氏疏螺旋体菌株于含有 5 mL BSKII(Sigma) 培养基的密封的 6 mL 玻璃试管中, 置 33°C 培养箱培养 1–2 周。培养过程中可以用暗视野显微镜观察菌体的生长情况, 待菌体生长到对数期( $10^8$ – $10^9$ /mL), 收集菌液并离心, 丢弃上清, 沉淀用 PBS 溶液悬浮, 同上离心洗涤 3 次, 收集沉淀, –20°C 保存备用。

**1.2.2 DNA 的提取:** 上述收集的伯氏疏螺旋体菌体沉淀用于基因组 DNA 的提取。应用基因组提取试剂盒, 根据操作说明书中所述的方法进行 3 个基因型伯氏疏螺旋体基因组 DNA 的提取。提取的基因组–80°C 保存备用。

**1.2.3 LAMP 反应体系:** LAMP 扩增反应在 25  $\mu$ L 体系中进行, 反应体系包括: 12.5  $\mu$ L LAMP 反应缓冲液[40 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 20 mmol/L KCl, 16 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 20 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2% Tween 20, 1.6 mol/L 甜菜碱, 2.8 mmol/L dNTPs], 0.9  $\mu$ L 引物混合液(40 pmol FIP、BIP, 5 pmol F3、B3), 2.0  $\mu$ L DNA 样品, 1.0  $\mu$ L (8 U) Bst DNA 聚合酶(New England Biolabs, M0275L)和 8.6  $\mu$ L 灭菌水。

**1.2.4 LAMP 反应条件测定:** LAMP 反应的条件一般选择在 60°C–65°C 条件下进行, 扩增的时间大约在 30–60 min 范围内。根据所设计的 LAMP 特异性引物, 选择可以将狭义伯氏、嘎氏、伽氏疏螺旋体进行分型的最佳反应条件。

**1.2.5 扩增产物的测序:** 将狭义伯氏、嘎氏、伽氏疏螺旋体 3 个基因型菌株 LAMP 特异性引物的 F2 和 B1c 做为 PCR 扩增的引物, 引物序列见下表 2。将 3 个基因型菌株的 LAMP 扩增产物 50 倍稀释, 分别用引物 F2 和 B1c 进行 PCR 扩增。PCR 反应在 50  $\mu$ L 体系中进行, 包含灭菌去离子水 37.7  $\mu$ L, 10  $\times$  PCR buffer (plus Mg<sup>2+</sup>) 5  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTPs Mixture 4  $\mu$ L, 上下游引物各 1  $\mu$ L, LAMP 反应产物模板 1  $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶 (5 U/ $\mu$ L) 0.3  $\mu$ L。扩增反应程序为: 94°C 3 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 35 个循环; 72°C 10 min。分别将 PCR 扩增产物回收, 连接到 pGEM-T Easy 载体, 转化到 JM109 感受态细胞后, 送菌液到上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

表 2 PCR 引物序列  
Table 2 The primers for PCR

名称 Name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
<i>Bb</i> F2	CAGCgTTTCAgTAGATTgC
B1c	TCCTTTAAgCTCAAgCTTgTCTAC
<i>Ba</i> F2	gTTCTAAAgACAAAACATCAACAgA
B1c	gTTCCATCgCTTTTCATTTCTgTAT
<i>Bg</i> F2	gAAAAACAATACTAAgAgCAAACg
B1c	AgTTCCTTCAAgAgCAAATCTT

**1.2.6 LAMP 反应特异性:** 以衣原体和支原体、立克次氏体、以及巴贝斯虫、泰勒虫等常见的蜱传病原的基因组为对照模板, 分别用狭义伯氏、嘎氏、伽氏疏螺旋体的特异性引物检测 LAMP 反应的特异性。

**1.2.7 LAMP 反应敏感性:** 分别将狭义伯氏、嘎氏、伽氏疏螺旋体的基因组 DNA 定量到 100 mg/L, 倍比稀释, 检测 LAMP 反应的敏感性。

## 2 结果

### 2.1 LAMP 反应条件选择结果

根据所设计的 3 套 LAMP 特异性引物, 选择用于区分 3 个伯氏疏螺旋体基因型菌株的最佳反应条件, 结果表明: 狭义伯氏疏螺旋体的分型鉴定在 60°C 水浴锅中扩增 60 min; 嘎氏疏螺旋体的分型鉴定在 65°C 水浴锅中扩增 40 min; 伽氏疏螺旋体的分型鉴定在 60°C 水浴锅中扩增 60 min。各反应扩增完成后立刻转入 80°C 水浴锅中灭活 2 min。各取扩增

产物 5  $\mu$ L, 以 TAE 为缓冲液, 在 2% 的琼脂糖凝胶 (含 0.5 mg/L 溴化乙锭) 中, 电压 75 V 电泳进行检测。

## 2.2 LAMP 反应结果

如图 1 所示, 本实验所设计的特异性引物在特定条件下可以对狭义伯氏疏螺旋体(*Bb*)、嘎氏疏螺旋体(*Ba*)、伽氏疏螺旋体(*Bg*) 的 3 个基因型菌株进行扩增。结果表明狭义伯氏疏螺旋体、嘎氏疏螺旋体、伽氏疏螺旋体基因组 DNA 都能被其特异性的引物扩增, 种间没有交叉反应, 灭菌超纯水的扩增为阴性。

## 2.3 LAMP 扩增产物鉴定结果

将 3 个基因型菌株 LAMP 反应的产物分别经过 PCR 扩增后, 将扩增的目的片段进行测序。测序结果与 NCBI 上已提交的序列比对显示均正确。

## 2.4 LAMP 特异性结果

LAMP 技术用于莱姆病病原的分型鉴定, 其电泳检测结果如图 2 所示。3 个基因型菌株的 LAMP 特异性引物只能将其对应的基因型菌株基因组进行扩增。对照组所有样品均为阴性, 表明狭义伯氏、嘎氏、伽氏疏螺旋体分别与衣原体、支原体、立克次氏体以及巴贝斯虫、泰勒虫等媒介传播的其他病原没有交叉反应, 设计的引物具有很好的特异性, 该方法可以用于这 3 种基因型伯氏疏螺旋体的分型鉴定。

## 2.5 LAMP 敏感性结果

分别用 3 个基因型菌株的特异性引物对已定量的基因组进行扩增, LAMP 反应的敏感性如图 3 所

示。狭义伯氏疏螺旋体的特异性引物可以检测到 2 ng 的基因组 DNA; 嘎氏疏螺旋体的特异性引物可以检测到 0.2 ng 的基因组 DNA; 伽氏疏螺旋体的特异性引物可以检测到 0.02 ng 的基因组 DNA。

## 3 讨论

目前, 用于伯氏疏螺旋体基因分型的方法有脉冲电泳、限制性片段多态性、核糖体分型、质粒谱分型、随机引物扩增的多态性指纹分析、PCR-RFLP 分析、16S rRNA 基因序列分析等<sup>[18]</sup>。这些方法能够进行微量样本的检测, 但是在所需要的设备、操作性、使用成本等方面仍有不足。LAMP 技术的出现解决了上述这些不足, LAMP 技术应用于核酸检测具有高特异性、高灵敏度、快速、所需设备简单等优点。LAMP 反应中, 所设计的 4 条特异性引物严格识别靶核酸序列上的 6 个独立区域, 具有很高的特异性, 反应在 30–60 min 内可以将靶基因扩增达到  $10^9$ – $10^{10}$  拷贝, 是 PCR 等核酸扩增技术的 10–100 倍, 反应速度快<sup>[19]</sup>。对于 LAMP 反应结果的判定可以通过凝胶电泳来检测, 也可以在反应产物中加入 PicoGreen 染料后肉眼观察颜色的变化来判定, 简单、快捷并且可以避免凝胶电泳中的污染<sup>[20]</sup>。

本研究基于伯氏疏螺旋体的外膜蛋白 A (*OspA*) 基因, 建立了一种用于区分这 3 种致病性基因型疏螺旋体的 LAMP 方法。实验中使用 LAMP 反应基本的 4 条引物具有很好的特异性。研究结果表明, 3 个基因型的伯氏疏螺旋体中, 狭义伯氏、嘎氏、伽氏

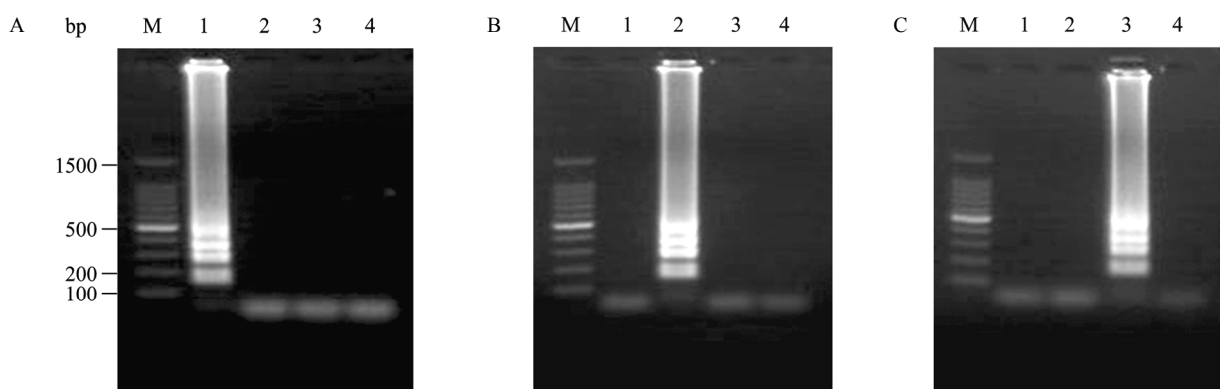


图 1 不同伯氏疏螺旋体扩增结果

Fig. 1 Amplification of *Bb*, *Ba* and *Bg* by LAMP

注: M: DNA 标准分子量 DL100; A: 狭义伯氏疏螺旋体; B: 嘎氏疏螺旋体; C: 伽氏疏螺旋体; 1–4: 狭义伯氏疏螺旋体, 嘎氏疏螺旋体, 伽氏疏螺旋体, 空白对照。

Note: M: Marker DL100; A: Amplification of *Bb* by LAMP; B: Amplification of *Ba* by LAMP; C: Amplification of *Bg* by LAMP; 1–4: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, negative control.

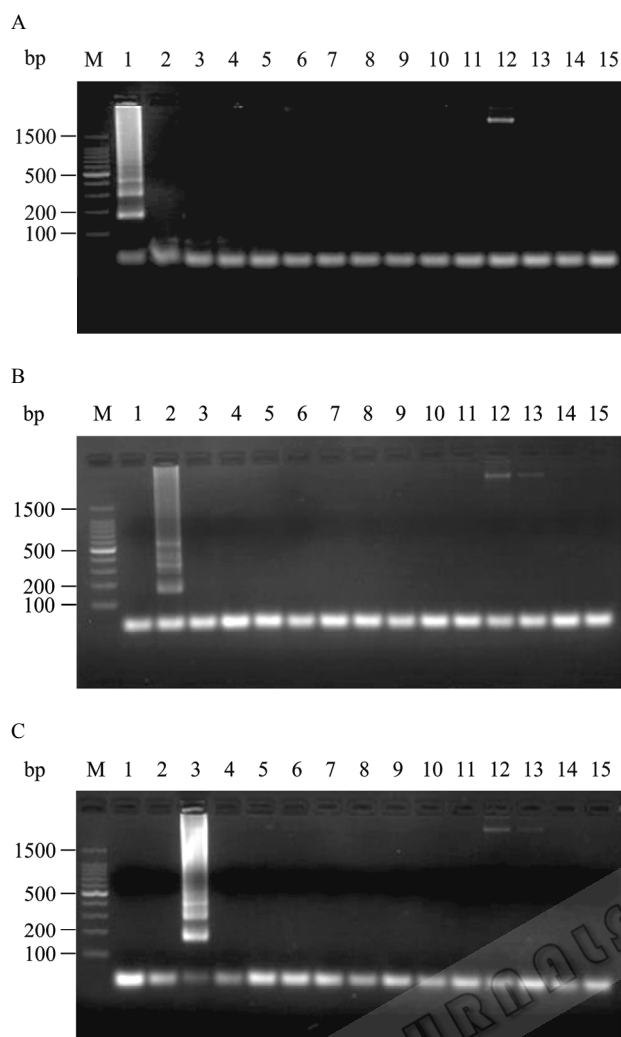


图2 不同伯氏疏螺旋体 LAMP 特异性引物扩增结果  
Fig. 2 Specificity of *Bb*, *Ba* and *Bg* specific primers in LAMP

注: M: DNA 标准分子量 DL100; A: 狭义伯氏疏螺旋体; B: 嘎氏疏螺旋体; C: 伽氏疏螺旋体; 1-15: 狭义伯氏疏螺旋体, 嘎氏疏螺旋体, 伽氏疏螺旋体, 鹦鹉热衣原体, 丝状支原体山羊亚种, 莫氏巴贝斯虫, 新疆巴贝斯虫未定种, 羊无浆体, 边缘无浆体, 尤氏泰勒虫, 吕氏泰勒虫, 牛巴贝斯虫, 双芽巴贝斯虫, 羊基因组, 空白对照。

Note: M: Marker DL100; A: Specificity of *Bb* specific primers in LAMP; B: Specificity of *Ba* specific primers in LAMP; C: Specificity of *Bg* specific primers in LAMP. 1-15: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *Chlamydia psittaci*, *Mycoplasma mucoidessush* sp. *capri*, *Babesia motasi*, *Babesia* sp. *xinjiang*, *Anaplasma ovis*, *A. marginale*, *Theileria uilenbergi*, *T. luwenshuni*, *Babesia bovis*, *B. bigimina*, Sheep genome, negative control.

疏螺旋体分别与另外两个基因型之间没有交叉反应; 与衣原体、支原体以及立克次氏体、巴贝斯虫、泰勒虫等一些常见的蜱传播病原之间也没有交叉反应。在实验的特异性结果中, 3 个基因型的伯氏疏螺旋

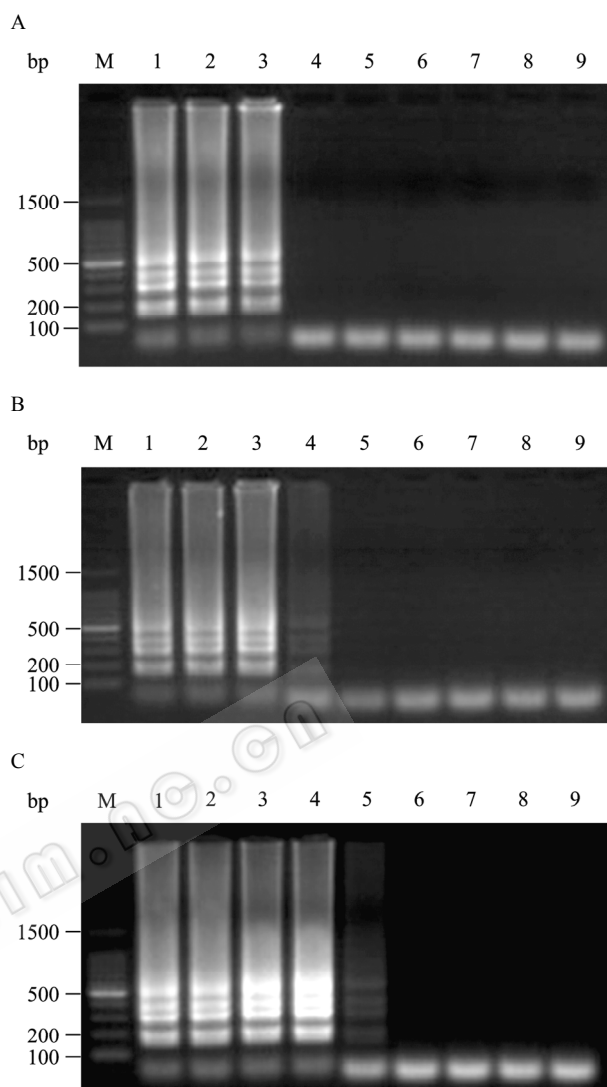


图3 不同伯氏疏螺旋体 LAMP 的感性结果  
Fig. 3 The sensitivity of LAMP for *Bb*, *Ba* and *Bg*

注: M: DNA 标准分子量 DL100; 1-9 分别为狭义伯氏(A)、嘎氏(B)、伽氏疏螺旋体(C)基因组: 100 mg/L, 10 mg/L, 1 mg/L, 100 µg/L, 10 µg/L, 1 µg/L, 0.1 µg/L, 0.01 µg/L, 0.001 µg/L.  
Note: M: Marker DL100; 1-9: *Bb* (A), *Ba* (B), *Bg* (C) DNA: 100 mg/L, 10 mg/L, 1 mg/L, 100 µg/L, 10 µg/L, 1 µg/L, 0.1 µg/L, 0.01 µg/L, 0.001 µg/L.

体的特异性引物分别对牛巴贝斯虫和双芽巴贝斯虫有一个非特异性的条带扩增, 但是单一的条带不能被认为是 LAMP 特异性扩增的结果。本实验中, 在特定的反应时间内, 3 套特异性引物能够对 3 个伯氏疏螺旋体基因型进行分型, 但是敏感性较低, 可能与靶序列以及特异性引物相关。LAMP 反应中, 环引物的引入有可能会解决敏感性低的问题。

根据以上实验结果, 该方法可以用于我国主要的 3 个致病性基因型伯氏疏螺旋体菌株的分型鉴

定。对我国莱姆病病原伯氏疏螺旋体的基因分型鉴定和临床治疗具有重要意义, 而且可以根据流行中的优势基因型菌株为疫苗研制和开发提供帮助。

总之, 本研究建立的基于 *OspA* 基因的 LAMP 技术是一种适用于我国莱姆病螺旋体基因分型的简便、快速、高特异性的方法, 具有很好的应用前景。

## 参考文献

- [1] Steer AC, Malawista SE, Snyder DR, et al. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in the three Connecticut communities. *Arthritis Rheum*, 1977(20): 7.
- [2] Steere AC, RL Grodzicki, AN Kornblatt, et al. The spirochetal etiology of Lyme disease. *N Engl J Med*, 1983(308): 733–740.
- [3] 万康林. 中国莱姆病的研究现状与展望. 中国媒介生物学及控制杂志, 1998, 6(9): 401–404.
- [4] Centers for Disease Control and Prevention. Lyme disease—United States, 2001–2002. *Morb Mortal Wkly Rep*, 2004(53): 365–369.
- [5] 何素敏, 杜卫东, 张学军. 莱姆病临床实验室诊断的研究进展. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2005(26): 9.
- [6] Maria E, Aguero-Rosenfeld, Guiqing Wang, et al. Diagnosis of Lyme *Borreliosis*. *C M Reviews*, 2005(18): 484–509.
- [7] Postic D, NM Ras, RS Lane, et al. Expanded diversity among Californian *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (Formerly *Borrelia* group DN127). *J Clin Microbiol*, 1998(36): 3497–3504.
- [8] Wang G, AP van Dam, A Le Fleche, et al. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). *Int J Syst Bacteriol*, 1997(47): 926–932.
- [9] Masuzawa T, Takada N, Kudeken M, et al. *Borrelia sinica* sp nov, a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001(51): 1817–1824.
- [10] Nataliia R, Maryna G, Libor G, et al. *Borrelia carolinensis* sp. nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi Sensu Lato* Complex from the Southeastern Region of the United States. *J Clin Microbiol*, 2009(47): 134–141.
- [11] Wang G, AP van Dam, I Schwartz, et al. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato*: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*, 1999(12): 633–653.
- [12] Van Dam AP, H Kuiper K Vos, A Widjojokusumo, et al. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme *borreliosis*. *Clin Infect Dis*, 1993(17): 708–717.
- [13] Brisson D, DE Dykhuizen, RS Ostfeld. Conspicuous impacts of inconspicuous hosts on the Lyme disease epidemic. *Proc Biol Sci*, 2008(275): 227–235.
- [14] Rauter C, Meuller M, Diterich I, et al. Critical evaluation of urine-based PCR assay for diagnosis of Lyme *borreliosis*. *Clin Diag Lab Immunol*, 2005(12): 910–917.
- [15] Morán-Cadenas F, Schneider H. A comparison of two DNA extraction approaches in the detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato* from live *Ixodes ricinus* ticks by PCR and reverse line blotting. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2007, 7(4): 555–561.
- [16] Daniele Postic, Marc V Assous, Patrick AD, et al. Grumont, Guy Baranton. Diversity of *Borrelia burgdorferi Sensu Lato* evidenced by restriction fragment length polymorphism of *rrf* (5S)-*rrl* (23S) intergenic spacer amplicons. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1994, 44(4): 743–752.
- [17] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): E63–e63.
- [18] 梁军刚. 莱姆病螺旋体的分类和种系发生研究进展. 中国人兽共患病杂志, 1996, 12(5): 40–43.
- [19] Yasuyoshi M, Tsugunori N. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J Infect Chemother*, 2009(15): 62–69.
- [20] 刘巍, 毛新亮. LAMP 技术及其在人类传染病病原体检测的研究进展应用预防医学. 2007, 13(4): 1673–1758.