

ICS 11.020
C 05

团 体 标 准

T/CPMA 007—2020

莱姆病诊断

Diagnosis of Lyme disease



2020-07-01发布

2020-10-01实施

中华预防医学会 发布

目 次

前言	II
引言	III
1 范围	1
2 术语和定义	1
3 缩略语	1
4 诊断依据	1
4.1 流行病学史	1
4.2 临床表现	1
4.3 实验室检查	2
5 诊断原则	2
6 诊断	2
6.1 疑似病例	2
6.2 临床诊断病例	2
6.3 确诊病例	2
7 鉴别诊断	2
附录 A (资料性附录) 莱姆病临床表现	3
附录 B (规范性附录) 莱姆病细菌学检查	5
附录 C (资料性附录) 莱姆病血清学检查	7
附录 D (资料性附录) 莱姆病螺旋体核酸检测	10
参考文献	13

前 言

本标准按照 GB/T 1.1 — 2009 给出的规则起草。

本标准由中华预防医学会归口。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心传染病预防控制所、首都医科大学附属北京地坛医院、吉林省疾病预防控制中心、黑龙江省牡丹江林业中心医院。

本标准主要起草人：郝琴、万康林、李兴旺、黄飏、杨修军、郑元春、张琳。



引 言

莱姆病于 1975 年在美国被发现报道，受人为活动和气候变化等因素的影响，其发生和流行的范围也不断扩大。近年来，我国发现了越来越多的莱姆病患者，但国家尚未将莱姆病纳入法定传染病管理。因为莱姆病临床表现的多样和诊断方法的不标准，经常导致莱姆病诊断困难，所以莱姆病诊断标准的建立是必要的。本标准遵循科学性和实用性原则，从流行病学、临床表现和实验室检测几方面综合考虑，使莱姆病的诊断规范、准确。



莱姆病诊断

1 范围

本标准规定了莱姆病的诊断依据、诊断原则、诊断和鉴别诊断。
本标准适用于全国各级医疗卫生机构对莱姆病的诊断。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

莱姆病 Lyme disease

由伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*, 也称莱姆病螺旋体) 引起的一种人兽共患性传染病, 主要为蜱 (等节肢动物) 叮咬人、兽而传播。主要表现为皮疹 (典型的为游走性红斑)、关节及神经系统等症状, 部分病人早期可伴有发热、乏力。

注: 莱姆病螺旋体基因型复杂多样, 我国主要的致病基因型为伽氏疏螺旋体 (*B.garinii*) 和阿弗西尼疏螺旋体 (*B.afzelii*)。

2.2

疫区 endemic area

以前至少有2名确诊的莱姆病病人或已证实媒介蜱感染有莱姆病螺旋体的地区。

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

EM: 游走性红斑 (Erythema migrans)

ELISA: 酶联免疫吸附分析 (Enzyme-linked immunosorbent assay)

IFA: 间接免疫荧光分析 (Indirect immunofluorescent assay)

WB: 蛋白免疫印迹 (Western immunoblot)

ACA: 慢性萎缩性肢皮炎 (acrodermatitis chronic atrophicans)

4 诊断依据

4.1 流行病学史

4.1.1 发病前数天或数月到过疫区, 有蜱暴露或叮咬史。

4.1.2 发病前没有去过已知的疫区，但有蜱暴露或叮咬史。

4.2 临床表现（参见附录 A）

4.2.1 典型的皮肤损害，呈“牛眼状”的游走性红斑（EM）。

4.2.2 神经系统损害，主要包括：脑膜脑炎、颅神经炎（特别是面神经麻痹）、神经根炎或其他神经系统损害。

4.2.3 有心脏损害并能排除有关疾病。

4.2.4 有单个或多个关节炎。

4.2.5 其他莱姆病症状：不典型皮肤损害（全身皮疹或红斑），或眼部损害，或精神异常等。

4.3 实验室检查

4.3.1 细菌学检测

皮肤红斑组织或血液、脑脊液等标本的细菌分离培养获得莱姆病螺旋体，或显微镜检查发现莱姆病螺旋体。细菌学检测方法见附录B。

4.3.2 血清抗体检测

血清学“两步法”检查莱姆病螺旋体特异抗体阳性（即初筛和确诊实验均为阳性），或ELISA/IFA 检测双份血清抗体滴度发生 4 倍及以上变化。血清抗体检测方法参见附录C。

4.3.3 核酸检测

皮肤红斑组织或血液、脑脊液等标本中莱姆病螺旋体特异性核酸片段检查阳性。核酸检测方法参见附录D。

5 诊断原则

根据流行病学史、临床表现、实验室检查进行诊断。

6 诊断

6.1 疑似病例

6.1.1 具有流行病学史3.1.1，并具有3.2.2~3.2.5的临床表现之一者。

6.1.2 具有流行病学史3.1.2，并具有3.2.1~3.2.5的临床表现之一者。

6.2 临床诊断病例

具有流行病学史3.1.1，并具有3.2.1的临床表现。

6.3 确诊病例

6.3.1 临床诊断病例，并具备 3.3.1~3.3.3 中任何 1 项者。

6.3.2 疑似病例，并具备 3.3.1~3.3.3 中任何 1 项者。

7 鉴别诊断

莱姆病主要与梅毒、回归热、森林脑炎、风湿和类风湿性关节炎、钩端螺旋体病、斑点热、斑疹伤寒、埃立克体病、无形体病、恙虫病等进行鉴别。



附录 A

(资料性附录)

莱姆病临床表现

A.1 概述

莱姆病(Lyme disease) 或莱姆病疏螺旋体病(Lyme borreliosis)的临床表现呈多样化。根据病程经过可将莱姆病分为早期和晚期感染, 早期感染包括 I 期(局部性游走性红斑)、II 期(播散性感染)及数周或数月内发生的间歇性症状。晚期感染或 III 期(持续性感染)多在疾病发生 1 年以后开始。病人可仅有一种病期, 也可有三种病期, 不少病人无 I 期过程, 而同时出现 II 期和 III 期临床症状。

A.2 游走性红斑(EM)

伯氏疏螺旋体通过蜱叮咬而被注入机体, 并在 60%~80% 病人皮肤内局部扩散, 形成游走性红斑。在蜱叮刺吸血后 7~10 天, 在叮咬处出现红色小斑或小丘疹, 逐渐扩大, 形成圆形或椭圆形皮疹, 外缘有鲜红边界, 中央逐渐褪色似平常皮肤, 直径一般为 5cm~50cm, 呈牛眼状。EM 可持续 1~4 周, 少数病人可持续数月。EM 可出现于身体的任何部位。但以躯干部多见。儿童 EM 常发生在面部。少数病人可出现非典型红斑, 例如致密性红斑、荨麻疹样红斑、湿疹样皮损, 肉芽肿、紫癜和硬斑病等。EM 有时伴有发热, 轻微全身症状或局部淋巴结肿大。

伯氏疏螺旋体进入体内数日或数周后即可通过血液或淋巴液播散到其他部位。在此期中可在血液内大量发现螺旋体, 此外在心肌、视网膜、肌肉、骨骼、滑液、脾脏、肝脏、脑膜及脑标本内也有少量发现。播散性感染期常见临床表现有流感样症状, 发热、畏寒、衰弱、肌肉关节痛、头痛、头晕、恶心、呕吐。并出现全身多发性红斑, 面神经麻痹、脑膜脑炎、神经根炎、心脏病、脊髓炎等。在播散性感染期, 也可引起关节呈游走性疼痛, 持续数天, 最常见是颞颌关节疼痛。

A.3 全身多发性红斑

约 10%~50% 病人在 EM 发生数日, 在身体的不同部位出现继发性红斑, 数目多少不一, 继发性红斑比原发 EM, 形态较小, 中心缺乏硬结, 移动性不明显。

A.4 面神经麻痹

在十二对颅神经损伤中, 以面神经损伤多见, 10% 播散性感染期病人可发生面神经麻痹。单侧比双侧神经麻痹多见。多数病人经治疗可完全恢复, 13% 可留有极小的痕迹, 0.8% 可有严重畸形, 可以从面神经麻痹病人的血液中分离出病原体。有人统计在流行地区 25% 的面神经麻痹是伯氏疏螺旋体感染所致。

A.5 脑膜炎

在感染伯氏疏螺旋体数日或数周（一般在一个月内），出现脑膜炎症状和体征，常见有头痛、发热、颈项强直、极度疲劳。脑脊液内细胞增加，主要为淋巴细胞和单核细胞，可从脑脊液中培养出病原体，并可从脑脊液中检测出抗体。患者可伴有面神经麻痹和周围神经根炎。

A.6 神经根炎及周围神经炎

累及感觉或运动神经，严重的游走性神经根疼痛及感觉异常，肢体软弱、麻木、刺痛或烧灼感。电生理检查，可显示轴索性多神经病变。肌肉电流图可显示神经传导有问题。

A.7 心脏病

在EM发生数周约有4%~8%病人出现心脏异常，常见有房室传导阻滞，多是轻度的，但个别病人病情较重，需戴起搏器。心肌心包炎，左室功能不全也可见到，少数病人可有心肌肥大和致死性全心脏炎，奥地利学者还从慢性心衰病人的心肌标本中分离出伯氏疏螺旋体。

A.8 关节炎

在EM出现数月后发生，或无EM在感染后2~3年内直接以关节炎形式出现，而且持续时间较长，早期感染的关节炎，发作常是短暂的，持续数天或数周，关节内有大量渗出物。而晚期感染的关节炎在第二年或第三年以慢性关节炎形式出现，表现以间歇性单关节或少数关节疼痛，多发生在大关节，特别多见于膝关节。其次是肩、肘、踝、腕等关节。主要表现是关节局部发热、疼痛及肿胀。类风湿样的对称性小关节炎少见。莱姆关节炎多有病理改变，滑膜显示绒毛肥大，血管增生及淋巴浆细胞浸润。80%病人呈现HLA—DR4频率增加，这类病人对抗生素治疗反应不佳。从关节液中分离螺旋体较困难，仅有少数几例病人分离培养出病原体，病人血液中特异性抗体常呈阳性。

A.9 慢性萎缩性肢皮炎（ACA）

欧洲约10%病人出现ACA，美国和中国也有报告。EM出现6个月或几年，皮肤变为蓝色或紫红色。皮肤逐渐变硬变薄，并可影响骨骼系统。出现萎缩性斑片，数目不定，可经过数月，数年或数十年，萎缩边缘由不清变得清楚，皮薄如纸，可见下面血管，好发于四肢、手背，可累及躯干。当萎缩斑有纤维化或硬化时很像硬斑病，应与硬皮病鉴别。常可从萎缩病变处分离出伯氏疏螺旋体。

A.10 进行性脑脊髓炎

晚期感染综合征表现在中枢神经系统病变，主要为进行性脑脊髓炎和亚急性脑炎。进行性脑脊髓炎主要表现为多发性硬化综合症，颅神经麻痹，强直性轻瘫，共济失调，膀胱功能紊乱，这类病人常没有EM病史，脑脊液特异性抗体是唯一证据。亚急性脑炎表现为一般中度头疼、疲倦、记忆力减退，睡眠障碍，情绪抑郁，语言表现障碍，神经性耳聋等。核磁共振成像显示在白质区有小的密度增厚性损伤。脑脊液中有特异性抗体。

A.11 周围神经炎

通常表现渐进性，由第二期持续逐渐变为慢性过程，脊椎疼痛，肢端感觉异常，反射减弱，肢体无力。

A.12 其他表现

眼部损害，包括结膜炎、角膜炎、虹膜炎、全葡萄膜炎、玻璃体炎、视网膜炎和视神经炎。此外还有肝炎，脾肿大，膀胱炎和呼吸衰竭的临床报告以及精神性格改变的病例报告。



附 录 B
(规范性附录)
莱姆病细菌学检查

B.1 患者标本的采集

B.1.1 采集标本时应遵循的原则

应在抗生素治疗开始前采集标本。

所需的血液与脑脊液标本，均应以穿刺方式取得。

B.1.2 血液标本

所有的疑似病例，应无菌操作采集非抗凝血液标本2份，1份1mL用于培养，1份5mL留取血清，用于抗体检测和核酸检测。首份标本采集后2w~4w应再次采集非抗凝血液标本5mL，留取恢复期血清。

B.1.3 脑脊液标本

莱姆病脑膜炎病人，除用于常规、生化检测采集的标本之外，应额外无菌操作采集脑脊液2份，每份1mL~2mL，1份用于培养，1份用于抗体检测和核酸检测。

B.1.4 皮肤标本

使用组织提取枪，无菌取皮肤红斑边缘（即红斑与正常皮肤组织边界部分）皮肤，一般直径3mm~5mm大小，直接接种BSKII培养基，留取部分样本用于核酸检测。

B.2 标本的保存和运输

用于培养的标本尽可能现场接种，或于-2~8℃冷藏保存，使用冰排低温运输，16h内接种培养基。用于血清抗体和核酸检测的标本于-20℃或更低温度冷冻保存，使用干冰冷冻运输。

B.3 显微镜检查

所有来自患者的标本，包括血液、脑脊液、皮肤等标本，应立即涂片，用直接免疫荧光法进行显微镜检查。发现带螺旋的细菌，即可作为诊断依据。荧光显微镜下检查莱姆病螺旋体如图B.1所示：

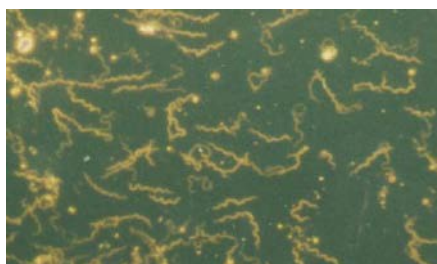


图 B.1 荧光显微镜下莱姆病螺旋体（40倍）

B.4 细菌分离培养

细菌分离培养所需时间较长，且分离阳性率较低，所以一般用于莱姆病的流行病学调查和监测。

B.4.1 标本处理

皮肤病灶标本、血液、脑脊液标本直接接种莱姆病专用的BSKII培养基。

B.4.2 挑选可疑菌

上述培养管在33℃孵育5~7天后，检查是否长出可疑的莱姆病螺旋体。莱姆病螺旋体的形态是一种单细胞疏松盘绕的左旋螺旋体，长5μm~25μm,宽0.2μm~0.5μm，运动形式有旋转、扭曲、抖动等。

B.5 莱姆病螺旋体菌株鉴定

可疑菌株可进行核酸检测，检出莱姆病螺旋体特异性核酸片段可判定为莱姆病螺旋体菌。参见附录D。

B.6 生物安全要求

根据原卫生部《人间传染的病原微生物名录》（卫科教发〔2006〕15号），伯氏疏螺旋体危害程度属于第三类。细菌分离培养、菌株鉴定、核酸提取等对样本和培养物的操作在BSL-2级实验室中进行，采用B类（UN3373）包装运输。

注：《人间传染的病原微生物名录》按照新版执行。

附 录 C
(资料性附录)
莱姆病血清学检查

C.1 莱姆病血清学检测两步法

在莱姆病诊断中以特异性抗体检测为主，莱姆病特异性抗体检测国际上公认的“两步法”如下：首先采用酶免疫分析（Enzyme immunoassay）或免疫荧光分析（Immunofluorescent assay）作为初筛，初筛阳性的标本再用蛋白免疫印迹法（Western immunoblot）进行检测。

C.2 抗体检测时间

在首次检视病人时采取首份血液标本，分离血清进行第一次抗体检测。根据病人的病程（一般为2~4周）获得恢复期血清后，进行第二次抗体检测。

C.3 酶联免疫吸附试验（ELISA）

为莱姆病特异性抗体检测两步法中的初筛方法之一。

C.3.1 试剂

莱姆病螺旋体ELISA检测试剂盒可用市场上的商品试剂盒，也可参考中国疾病预防控制中心传染病预防控制所莱姆病室的检测试剂。

C.3.2 血清检测

商品试剂盒按说明书操作。

中国疾病预防控制中心传染病预防控制所莱姆病室检测试剂按以下步骤操作：

血清标本用加吐温的磷酸盐缓冲液PBS-T(0.01mol/L, pH7.4的PBS溶液, 加0.5%的Tween-20)稀释至1:500加入酶标板, 两孔平行检测, 每孔50 μ L。每板做样品、阳性血清、阴性血清和空白对照孔, 各2个平行检测。然后在各反应孔中加入用PBS-T稀释的工作浓度辣根过氧化酶标记抗人IgG 50 μ L, 酶标板置37 $^{\circ}$ C湿盒中孵育30min。甩干孔内溶液, 每孔加PBS 300 μ L洗涤3次~5次, 每次5min。

C.3.3 显色

于各反应孔中加入显色液（TMB即用型）100 μ L, 置暗处30min。每孔加入显色终止液（0.5mol/L H₂SO₄）100 μ L, 终止显色。

C.3.4 结果判断

终止显色后30min内, 用酶标仪在波长450nm处, 以空白对照孔调零后测各孔OD值。OD值大于0.13, 定为阳性。

阳性界值的确定：是对有代表性的健康群体人群进行莱姆病血清抗体检测，求出平均OD值。如果检测对象的OD值大于平均值的3个标准差，则为阳性；如果OD值介于2~3个标准差之间，为可疑；小于1个标准差为阴性。

C.4 间接免疫荧光法（IFA）

为莱姆病特异性抗体检测两步法中的初筛方法之一。

C.4.1 抗原片

莱姆病螺旋体IFA检测抗原片可用市场上的商品试剂盒。也可参考中国疾病预防控制中心传染病预防控制所莱姆病室IFA的检测方法和试剂。

C.4.2 血清检测

商品试剂盒按说明书操作。

中国疾病预防控制中心传染病预防控制所莱姆病室检测试剂按以下步骤操作：

- a) 待检血清用PBS（0.01 mol/L，PH7.4）做倍比稀释，一般按1:16；1:32；1:64；1:128；1:256稀释。同时每次需设立阳性对照和阴性对照各两孔；
- b) 每个稀释度的血清20 μ L加于抗原片上，置于37 $^{\circ}$ C孵育30min；
- c) 取出，用PBS浸泡10min，倒出后用蒸馏水冲洗；
- d) 加FITC标记的抗人IgG（或IgM）抗体，置于37 $^{\circ}$ C孵育30min；
- e) 取出，用PBS清洗5次，每次5min；
- f) 吹干，用90%甘油封片。

C.4.3 结果判断

商品试剂盒依据说明书，不同试剂盒的判读标准不一致。

中国疾病预防控制中心传染病预防控制所IFA血清检测结果判定：将抗原片置于荧光显微镜下看结果，高滴度的血清，每视野至少50%菌体染上明亮荧光者即为此滴度阳性。IgM \geq 1:64判定本份标本IgM阳性；IgG \geq 1:128，判定为本份标本IgG阳性。

C.5 蛋白免疫印迹法（WB）

为莱姆病特异性抗体检测“两步法”中的确诊方法。

C.5.1 膜条

莱姆病螺旋体WB膜条和相关试剂可用市场上的商品试剂盒。也可参考中国疾病预防控制中心传染病预防控制所莱姆病室的检测试剂。

C.5.2 血清检测

商品试剂盒按说明书操作。

中国疾病预防控制中心传染病预防控制所莱姆病室检测试剂按以下步骤操作：

- a) 用PBS-T将待检血清25稀释；同时将阳性血清和阴性血清按要求的滴度稀释。

- b) 将制备好的硝酸纤维素膜条浸泡于稀释后的血清中；
- c) 置于水平摇床震荡 3h；
- d) 将膜条取出，用PBS-T洗5遍，每次10min；
- e) 加入稀释的羊抗人IgG-HRP或羊抗人IgM-HRP酶标二抗，置于水平摇床3h；
- f) 将膜条取出，用PBS-T洗5遍，每次10min；
- g) 加入显色液（HRP-DAB底物显色试剂），1min~3min后观察。

C. 5. 3 结果判断

C. 5. 3. 1 使用伽氏疏螺旋体 (*B. garinii*) 制作的WB膜条检测，出现如下条带中的一条，即为阳性：

IgG: P83 /100, P58, P39, P30, OspC, P17, P66, OspA 。

IgM: P83/100, P58, OspA, P30, OspC, P17, P41 。

C. 5. 3. 2 使用阿弗西尼疏螺旋体 (*B. afzelii*) 制作的WB膜条检测，出现如下条带中的一条，即为阳性：

IgG: P83/100, P58, P39, OspB, P30, P28, OspC, OspA, P17, P14 。

IgM: P83/100, P58, P39, OspA, P30, P28, OspC, P17, P41 。

注：上述蛋白条带注释如下：

P83 /100, 莱姆病螺旋体外膜蛋白之一，在不同菌株中分子量各不相同，主要包括P83、P93、P97和P00。

P66, 莱姆病螺旋体外膜蛋白之一，是一种黏附素，由bb0603基因编码。

P58, 莱姆病螺旋体外膜蛋白之一，分子量约为58KD。

P41, 即鞭毛蛋白 (Fla) 。

P39, 即BmpA, 是一种早期表达蛋白。

P30, 莱姆病螺旋体外膜蛋白之一，分子量为30KD。

P28, 莱姆病螺旋体外膜蛋白之一，分子量为28KD。

OspA, 外膜蛋白A, 中国菌株分子量多为31~32KD。

OspB, 外膜蛋白B, 中国菌株分子量多为35~36KD。

OspC, 外膜蛋白C, 中国菌株分子量多为20~22KD。

P17, 莱姆病螺旋体外膜蛋白之一，分子量约为17KD。

P14, 莱姆病螺旋体外膜蛋白之一，分子量约为14KD。

附录 D
(资料性附录)
莱姆病螺旋体核酸检测

在莱姆病诊断中以特异性抗体检测为主，核酸检测是抗体检测的补充。以避免在抗体检测阴性的“窗口期”漏诊的情况。莱姆病特异性核酸检测在本标准中包括巢式PCR和real-time PCR方法。巢式PCR检测的是莱姆病螺旋体的特异区段5S-23S rRNA基因间隔区，是莱姆病螺旋体特有并且可测序进行单个位点分型；real-time PCR方法比普通PCR方法更快速、敏感度更高，并可以相对检测菌的载量。

D.1 聚合酶链式反应（PCR）检测莱姆病螺旋体特异基因

D.1.1 目标基因

从标本中检测莱姆病螺旋体核酸时，通常以5s-23s rRNA 基因间隔区作为目标基因，也可选择其他特异性基因。

D.1.2 参考引物序列

第一轮：

上游引物：5'-CGACCTTCTTCGCCTTAAAGC-3'

下游引物：5'-TAAGCTGACTAATACTAATTACCC-3'

第二轮：

上游引物：5'-TCCTAGGCATTCACCATA-3'

下游引物：5'-GAGTTCGCGGGAGA-3'

扩增片段长度约为250bp（不同菌株扩增片段长度可略有差异）。

注：合成的引物通常为冻干产品，开盖前应进行短暂离心，使用时需要溶解并稀释成储备液。按照每nmol加10 μ L的量加入纯水，即可配制成100 μ mol/L储存液，用时取少量稀释10倍即为工作浓度（10 μ mol/L）。

D.1.3 标本处理

D.1.3.1 原始标本采用试剂盒法

使用市售基因组DNA提取试剂盒，具体操作方法按试剂盒说明进行。

D.1.3.2 纯培养菌株，采用简易模板制备方法

细菌接种于BSKII培养基，33 $^{\circ}$ C培养7d~10d；5mL~10mL菌液离心，PBS洗涤3次，悬浮于装有500 μ L TE缓冲液的1.5mL eppendorf管中；100 $^{\circ}$ C加热10min；6000rpm离心5min；吸取上清液为模板，用于PCR检测。

D.1.4 PCR反应体系

一次总量25 μ L的反应体系如表D.1所示：

表 D.1 PCR 反应体系中的成分及加样量

试剂	体积
酶和缓冲液 (2 \times)	12.5 μ L
上游引物(10 μ mol/L)	1 μ L
下游引物(10 μ mol/L)	1 μ L
待测模板 (阳性对照)	3 μ L~5 μ L (1 μ L~2 μ L)
灭菌蒸馏水	补足至25 μ L

反应设立质控参数：使用无菌水作为阴性对照；用已知莱姆病螺旋体菌模板作为阳性对照。

加样顺序：首先加入阴性对照，然后加标本模板，最后加入阳性对照。

D. 1. 5 PCR 扩增

第一轮：预变性94 $^{\circ}$ C 5min，1个循环；变性94 $^{\circ}$ C，45s，退火55 $^{\circ}$ C，45s，延伸72 $^{\circ}$ C，45s，35个循环；最后72 $^{\circ}$ C 延伸5 min。

第二轮：预变性94 $^{\circ}$ C 5min，1个循环；变性94 $^{\circ}$ C，45s，退火58 $^{\circ}$ C，45s，延伸72 $^{\circ}$ C，45s，35个循环；最后72 $^{\circ}$ C 延伸5 min。

D. 1. 6 PCR扩增产物的检测分析

D. 1. 6. 1 琼脂糖凝胶制备 (1.5%)

称取1.0g琼脂糖，倒入耐热玻璃瓶内，再加入电泳液 (0.5 \times TBE) 100mL，轻轻混匀后加热，使琼脂糖完全熔化。待琼脂糖胶温度降至50 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C，加入核酸染料 (Gold View 5 μ L)，轻轻混匀。将其倒入制胶板，插好电泳梳子。待胶完全凝固 (30min~60min) 之后，将梳子拔出。

D. 1. 6. 2 电泳

将制备好的电泳胶放入电泳槽 (带梳子孔的一端在阴极)，倒入电泳液 (0.5 \times TBE) 浸过胶面即可。PCR产物各取5 μ L加入凝胶孔 (不含染料的mix需要加入1 μ L上样缓冲液)，加入Marker 5 μ L，6V/cm 电泳40min。

D. 1. 7 结果判读

如莱姆病螺旋体靶基因扩增阳性，则表明检测标本阳性。

D. 2 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-Time PCR) 检测莱姆病螺旋体特异基因

D. 2. 1 目标基因

从标本中检测莱姆病螺旋体时，以莱姆病螺旋体重组酶基因 (recA) 作为目标基因，也可选择其他特异性基因。

D. 2. 2 参考引物和探针序列

针对recA基因的引物和探针的具体信息见表D.2。

注：引物和探针稀释方法同D.1.2。

表 D.2 recA 基因的引物和探针的具体信息

名称	序列	探针 标记	长度 (bp)	GC 含 量 (%)	Tm值 (°C)
recA-F	5'-GTT CTG CAA CAT TAA CAC CTA AAG CTT-3'		27	37%	55
recA-R	5'-AGG TGG GAT AGC TGC TTT TAT TGA T-3'		25	40%	54
recA-P	5'-FACAGGATCAAGAGCATGP-3'	FAM , MGB	17	47%	45

D. 2. 3 标本处理：

同D.1.3。

D. 2. 4 Real-Time PCR反应体系

Real-Time PCR反应体系见表D.3。

表D.3 Real-Time PCR 反应体系中的成分及加样量

试剂	体积
酶和缓冲液	10 μ L
上游引物(10 μ mol/L)	0.4 μ L
下游引物(10 μ mol/L)	0.4 μ L
探针溶液(10 μ mol/L)	0.4 μ L
待测模板（阳性对照）	3 μ L~5 μ L（1 μ L）
灭菌蒸馏水	补足至20 μ L

反应设立质控参数：使用无菌水作为阴性对照；用已知莱姆病螺旋体 recA 基因的克隆 T 载体作为阳性对照。

加样顺序：首先加入阴性对照，然后加标本模板，最后加入阳性对照。

D. 2. 5 Real-Time PCR扩增

一般使用两步法进行扩增，参考程序如下：

预变性 95 $^{\circ}$ C 2min，1 个循环；

扩增反应：95 $^{\circ}$ C 10s，54 $^{\circ}$ C 30s，40 个循环。

不同的荧光定量 PCR 仪扩增的程序会有一些差异，可根据所使用的仪器对反应程序进行适当调整。

D. 2. 6 结果判定

待检标本中莱姆病螺旋体DNA \geq 10拷贝时，判断为阳性。

参 考 文 献

- [1] GBZ 324-2019 职业性莱姆病的诊断
- [2] 张哲夫,万康林,张金声,等. 我国莱姆病的流行病学和病原学研究. 中华流行病学杂志.1997,18(1):4.
- [3] 张刘丽,侯学霞,耿震,等.巢式PCR用于疑似莱姆病患者血清标本检测的研究.中国媒介生物学及控制杂志.2013,24(1):8-10.
- [4] Geng Z, Hou XX, Zhang L, et al. Evaluation of a new real-time PCR assay for detection of *Borrelia burgdorferi* in rodents. Chinese Journal of Zoonoses.2015,31(5):812-816.
- [5] Lyme Disease: Recommendations for Diagnosis and Treatment. Annal of Internal Medicine. 1991,114: 472-481.
- [6] Hao Q, Hou X, Geng Z, et al. Distribution of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in China [J]. Journal of clinical microbiology, 2011, 49(2): 647-50.
- [7] Jiang Y, Hou X, Geng Z, et al. Interpretation Criteria for Standardized Western Blot for the Predominant Species of *Borrelia Burgdorferi Sensu Lato* in China. Biomed Environ Sci. 2010,23(5):341-349.
- [8] Liu ZY, Hao Q, Hou XX, et al. A study of the technique of Western Blot for Diagnosis of Lyme Disease caused by *Borrelia afzelii* in China. Biomed Environ Sci. 2013,26(3):190-200.
-