

Borelioza - niebezpieczna choroba z Lyme. Ogólna charakterystyka i diagnostyka laboratoryjna zakażenia.

Wiele chorób uznawanych wcześniej za typowo zwierzęce jest coraz częściej rozpoznawanych u ludzi. W większości są to choroby mało poznane. Jedną z nich jest borelioza, zwana również chorobą z Lyme lub krętkowicą kleszczową. Ta groźna choroba wielonarządowa jest jedną z chorób odzwierzęcych (zoonoz) przenoszonych przez kleszcze, ale nie tylko. Źródłem zakażenia, choć rzadziej mogą być bąki, gzy, a nawet komary. Obecnie borelioza postrzegana jest coraz częściej, jako coś więcej niż tylko pojedyncza infekcja, stąd przez Lyme disease (Lyme disease complex syndrom) rozumie się zespół różnych patogenów odkleszczowych (współinfekcji lub koinfekcji), które mogą jej towarzyszyć.

Mechanizm zakażenia jest prosty, a przez to niezwykle niebezpieczny: wystarczy małe, bezbolesne ugryzienie, aby wraz ze śliną owada do organizmu dostały się chorobotwórcze patogeny. Rezerwuarem zarazków jest około 300 różnych gatunków ssaków (głównie gryzoni, ale też wolno żyjące jelenie, sarny czy wilki) oraz wiele ptaków. Kręgowce będące ofiarami kleszczy dostarczają nie tylko pożywienia, są też środkiem transportu, za pomocą którego pasożyty mogą się przemieszczać. Kleszcze są niezwykle niebezpiecznymi nosicielami krętków, ponieważ zarażać mogą wszystkie jego formy rozwojowe: larwa, nimfa i postać dojrzała.

Bakterie są przenoszone głównie ze śliną kleszczy z rodzaju *Ixodes* (w Europie *I. ricinus*). Kleszcz staje się nosicielem, zakażając się od swego żywiciela. Kolejne stadia rozwojowe kleszcza zakażają następnych żywicieli, powodując utrzymywanie się rezerwuaru zarazków w środowisku. W taki też sposób dochodzi do zakażenia człowieka.

Epidemiologia

Borelioza występuje tam gdzie są odpowiednie warunki dla życia kleszczy tzn. odpowiednia wilgotność, roślinność oraz zwierzęta. Najczęstszym miejscem występowania kleszczy są zatem lasy liściaste, zarośla przy uczęszczanych przez zwierzęta i ludzi szlakach, łąki oraz ogródki. Do grupy osób szczególnie zagrożonych zakażeniem krętkiem boreliozy należą pracownicy przemysłu leśnego oraz rolnicy. Większość nowych przypadków boreliozy jest notowana między 1 maja a 30 listopada, a 80% przypadków występuje w czerwcu i lipcu, w okresie żerowania mikroskopijnych, trudnych do zauważenia nimf kleszczy.

Według WHO Europa jest regionem endemicznego występowania boreliozy. Zapadalność waha się od kilku do ponad 100 zachorowań na 100 000 mieszkańców.

W Polsce rejonami endemicznymi są Mazury, Białowieża, Suwalszczyzna, województwo podlaskie i zachodniopomorskie.

Dane z niektórych obszarów zagrożonych występowaniem boreliozy u ludzi wskazują na ciągły wzrost liczby chorych.

W Polsce obowiązek zgłaszania zachorowań wprowadzono dopiero w 1996 roku. Niestety, brak jest w ogóle danych sprzed roku 1996. Według danych Państwowego Zakładu Higieny (PZH) w 2004 roku odnotowano 3822 potwierdzonych i prawdopodobnych zachorowań na boreliozę, w 2005 r. - 4409, w 2006 r. - 6694, w 2007 r. - 7735, do 15 grudnia 2008 r. - 7808 przypadków. Oficjalne statystyki

mówią o ok. 9-10 przypadkach zakażenia na 100.000 ludności, ale według PZH dane te mogą być zaniżone nawet dziesięciokrotnie, porównując sytuację w naszym kraju z krajami sąsiednimi. Jeszcze kilka lat temu mówiono, że tylko, co 10-12 kleszcz przenosi boreliozę, obecnie może być to już nawet, co trzeci pajęczak. Zaniżone i niedokładne dane wynikają z tego, że choroba nie zawsze jest zgłaszana do odpowiednich służb zajmujących się tworzeniem statystyk i raportów epidemiologicznych. Z tego wynika, że w Polsce na tę zoonozę zapada ok. 40.00 osób rocznie. Ocenia się, że odsetek zakażonych kleszczy w niektórych rejonach Polski wynosi nawet 60%.

Historia choroby

Pierwsze podejrzenie, że ugryzienie przez kleszcza może mieć związek z występowaniem niektórych objawów pojawiły się na początku XX wieku. W 1909 roku Arvid Afzelius- szwedzki dermatolog, jako pierwszy zbadał zależność między występowaniem rumienia wędrującego, a ukąszeniem kleszcza. Wyniki swych badań przedstawił na spotkaniu Szwedzkiego Towarzystwa Dermatologii.

Dopiero w 1975 roku borelioza została rozpoznana w okolicy miasta Lyme, w stanie Connecticut (Stany Zjednoczone). Od nazwy tej miejscowości wzięta się nazwa choroby. Serie badań doprowadziły naukowców do odkrycia bakterii odpowiedzialnej za rozwój boreliozy w organizmie ludzkim. Odkrywcą bakterii był doktor Willy Burgdorfer, który w 1982 roku wyizolował z kleszcza krętki bakterii, które później na jego cześć nazwano *Borrelia burgdorferi*. Dopiero on udowodnił związek między ukłuciem kleszcza, a występowaniem choroby. Nazwa gatunkowa bakterii „*Borrelia*”- pochodzi od nazwiska strasburskiego bakteriologa Amedee Borrela, który odkrył go w 1905 roku.

Borelioza u człowieka

Borelioza ma postać wczesną i późną (przewlekłą). Wczesna postać boreliozy często ogranicza się tylko do objawów skórnych i jest to tzw. rumień wędrujący. Powstaje on w miejscu ukłucia przez kleszcza. Rumieniowi często towarzyszą objawy grypopodobne. Pojawia się zazwyczaj po około 1-3 tygodni od momentu ukąszenia, zazwyczaj znika samoistnie po około miesiącu. Jeśli pozostaje dłużej może to świadczyć o rozprzestrzenieniu się krętków i przejściu choroby z postaci skórnej do wczesnej rozsianej.

Początkowo rumień ma postać czerwonej plamki, rozchodzącej się promieniście, wewnątrz znajduje się niewielki obszar niezmienionej chorobowo skóry lub przejaśnienie. Może wystąpić postać nietypowa- z nieregularną obwódką, tendencją do zmian krwotocznych, bez wewnętrznego przejaśnienia, o średnicy około 5 cm. Rumień jednolity pojawiający się szybko (w ciągu 1-3 dni od kontaktu z owadem) i o średnicy mniejszej niż 5 cm może wskazywać przeciwko rozpoznaniu boreliozy (wg wytycznych Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych). Ostatnie badania europejskiego towarzystwa naukowego EUCLAB mówią jednak o coraz częstszym pojawianiu się rumieni wędrujących o średnicy poniżej 5 cm.

Ważny jest nie tylko wygląd i rozmiar rumienia czas, po jakim się pojawia. Rumień w boreliozie pojawia się nie wcześniej niż 3 dni po pokąsaniu przez kleszcza, a czas jego utrzymania jest długi.

W przeciwieństwie do niego rumień np. alergiczny pojawia się szybko (1-3 dni) i zazwyczaj szybko znika. Należy pamiętać, że rumień nie pojawia się w ogóle aż u 40-70 % pokąsanych, często pozostaje

też niezauważony, jeśli wystąpił na niewidocznej części ciała np. na plecach czy głowie. Dlatego niezwykle ważne jest by dokładnie sprawdzić całe ciało po powrocie z lasu, parku lub innego miejsca gdzie zagrożenie ukłucia przez kleszcza jest wysokie.

Wystąpienie rumienia jest bezwzględnym wskazaniem do rozpoczęcia antybiotykoterapii, której czas trwania jest uzależniony od postępu choroby. Najczęściej trwa ona od 4 do 6 tygodni. Im później od ukąszenia wdroży się antybiotykoterapię, tym większe jest prawdopodobieństwo rozprzestrzenienia się krętków bakterii w organizmie, zakażenia innych tkanek, co powoduje wydłużenie terapii antybiotykami. Jeśli rumieni jest kilka może to być oznaką o procesie rozsianym. Bardzo ważne jest odpowiednio wczesne zdiagnozowanie i rozpoczęcie terapii, ponieważ im później od momentu zakażenia leki zostaną podane, tym mniejsza jest ich skuteczność.

Niestety, oprócz rumienia wędrującego borelioza nie ma typowych dla siebie objawów. U każdego z chorych mogą wystąpić inne. Na liście kontrolnej objawów tej choroby znajduje się ponad 60 różnych dolegliwości, a jak podkreślają autorzy- wciąż jest niepełna. W czasie diagnozy należy przede wszystkim sprawdzić profil ryzyka zakażeniem, czyli przebywanie w miejscach gdzie jest ono najłatwiejsze (lasy, parki, ogrody, brzegi rzek). Następne w kolejności są objawy z narządów i układów, przede wszystkim mózg, narządy słuchu i wzroku, układ oddechowy oraz objawy psychiczne jak zmiany nastroju, zaburzenia snu, wahania temperatury i wiele innych.

Tajemnicza bakteria

Bakteria *Borrelia burgdorferi* odpowiedzialna za rozwój choroby w przeciwieństwie do wielu innych bakterii, występuje w kilku formach: jako krętek, forma L (bez ściany komórkowej) oraz cysta. Jest to tak zwany polimorfizm. Każda z form jest wrażliwa na inny rodzaj antybiotyku. Wykazano też, że posiadają możliwość transformacji, czyli przekształcenia się jednej formy w inną. Potrzebują na to zaledwie kilka godzin. Forma, jaką przyjmuje bakteria zależy od wielu czynników między innymi od warunków środowiska, w jakim bakteria się znajduje. Bakterie z krwią wędrują do tkanki łącznej (ścięgna, skóra oraz naczynia krwionośne), mięśni oraz tkanki nerwowej. Znajduje się je licznie we wzgórzu, korzeniach grzbietowych rdzenia kręgowego, miazdze zębowej oraz gałkach ocznych.

Różnorodność form bakterii sprawia, że jest ona bardzo trudna do zwalczania, a w czasie leczenia należy podawać różne rodzaje antybiotyków. W zwalczaniu krętków najlepiej sprawdzają się penicyliny i cefalosporyny. Cysty ulegają zniszczeniu pod wpływem metronidazolu i tinidazolu, a formę L można unieszkodliwić za pomocą tetracyklin lub makrolidów. Krętki wytwarzają energię poprzez beztlenowy rozkład glukozy, w czasie leczenia pomocniczo stosuje się więc dotlenianie organizmu. Mimo znajomości szkodliwych dla bakterii antybiotyków leczenie jest długotrwałe głównie ze względu na zdolność bakterii do transformacji, gdy w organizmie znajdują się antybiotyki niszczące daną formę. Z tego też powodu w czasie leczenia stosuje się wiele antybiotyków by zminimalizować ryzyko przetrwania którejs z form bakterii mimo terapii. Dodatkowym utrudnieniem jest fakt, iż antybiotyki nie zagrażają bakterii, gdy ta znajduje się w stanie spoczynku. Bakterie mogą być zniszczone tylko wtedy, gdy zaczynają się dzielić, tworząc nową ścianę komórkową. Czas podziału *Borreli* to 12 do nawet 24 godzin, podczas gdy innym bakteriom wystarcza kilkanaście minut. Krętki, cysty i formy L mogą przetrwać w uśpieniu wiele lat czekając na sprzyjające warunki i powodując

nawroty choroby, lub w czasie ciąży zaatakować organizm dziecka. Nieleczona borelioza rzadko bywa bezpośrednią przyczyną śmierci, ale wyraźnie obniża jakość życia.

Objawy chorobowe mają związek z określonym gatunkiem krętka:

- a) *B. burgdorferi* powoduje objawy artretyczne atakując stawy organizmu,
- b) *B. garinii* jest przyczyną objawów neurologicznych,
- c) *B. afzelii* powoduje przewlekłe symptomy skórne.

Przyczyną objawów chorobowych jest toksyna bakteryjna, której ilość z biegiem czasu się zwiększa. Bakteria zakłada mikroskopijne cysty, które wypełnione są toksyną i formami przetrwalnikowymi bakterii. Cysty mają zdolność otwierania się, uwalniając przetrwalniki, które później przybierają dojrzałą postać krętka. Nawet zamknięte cysty uwalniają toksynę, podrażniając otaczające tkanki, powodując nasilenie się objawów.

Diagnostyka laboratoryjna boreliozy

Rozpoznanie boreliozy opiera się na dokładnie zebranych wywiadzie chorobowym oraz badaniu przedmiotowym pacjenta. Wyniki testów laboratoryjnych potwierdzają lub poddają w wątpliwość podejrzenie kliniczne. Wykonywanie testów serologicznych lub molekularnych u pacjentów z niecharakterystycznymi objawami ogólnymi niesie ryzyko uzyskania wyników fałszywie dodatnich. Z drugiej strony, charakterystyczny obraz rumienia wędrującego, patognomoniczny dla wczesnej, miejscowej postaci boreliozy, nie wymaga potwierdzenia testami laboratoryjnymi.

Testy serologiczne w diagnostyce boreliozy z Lyme są badaniami laboratoryjnymi z wyboru. Wykrywają one przeciwciała przeciwko *B. burgdorferi*. Wytwarzanie immunoglobulin M (IgM) zaczyna się około 2 tygodni po zakażeniu i osiąga szczyt około 2 miesiąca, a następnie w większości przypadków ich ilość stopniowo spada i zaczyna się produkcja immunoglobulin G (IgG).

Należy pamiętać, że przeciwciała IgM i IgG mogą utrzymywać się u części osób przez miesiące, a nawet lata po skutecznym leczeniu boreliozy. Dlatego zwykle niecelowe jest kontrolowanie stężenia przeciwciał po leczeniu gdyż nie występuje korelacja poziomu przeciwciał i obrazu klinicznego choroby.

Wyjątkiem jest podejrzenie ponownego zachorowania na boreliozę z Lyme, co zdarza się u osób zamieszkujących tereny endemiczne, narażonych na kontakt z kleszczami.

Interpretując wyniki badań serologicznych, musimy brać pod uwagę, że:

- Dodatni wynik badania potwierdza rozpoznanie boreliozy, ale nie można opierać rozpoznania jedynie na dodatnim wyniku,
- Testy powinny być wykonywane jedynie u osób z uzasadnionym klinicznie podejrzeniem boreliozy,
- Zarówno przeciwciała IgG jak i IgM mogą utrzymywać się przez lata po leczeniu: nie leczymy chorych z powodu pozytywnych wyników badań serologicznych!
- Ujemny wynik testu u osoby z podejrzeniem późnej postaci boreliozy praktycznie wyklucza to podejrzenie.

Bywa, że silna immunologiczna odpowiedź humoralna, wyrażona wysokim stężeniem przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* może być wykrywana u osób wyleczonych przez wiele lat od zakażenia. Wydaje się, iż zmniejszenie stężenia swoistych przeciwciał, jeśli do tego dojdzie, przemawia za wyleczeniem zakażenia.

Wśród metod diagnostycznych najczęściej stosowanych do laboratoryjnego potwierdzenia bądź wykluczenia boreliozy wyróżnia się badanie odczynów serologicznych, a wśród nich:

- test immunofluorescencji pośredniej (IFA), metoda ELISA, technika Western-blot oraz PCR (łańcuchowa reakcja, polimerazy). Dodatkowo w Polsce dostępne są badania układu immunologicznego takie jak: C6 lyme lub LTT borelioza (test poszukuje pobudzonych limfocytów T). Test LTT jest bardzo czuły i przydatny- szczególnie do diagnostyki późnej lub wczesnej rozsianej, ale trwającej kilka tygodni lub miesięcy boreliozy.

Test ELISA

ELISA znana jako test immunoenzymatyczny polega na identyfikacji specyficznych przeciwciał, które obecne są w surowicy pacjenta zakażonego boreliozą. Wśród przeciwciał najistotniejszą rolę odgrywają immunoglobuliny IgG lub/i IgM, gdyż to właśnie one są zazwyczaj kojarzone z zakażeniem. Diagnostyka laboratoryjna boreliozy opiera się więc na kontrolowaniu wzrostu immunoglobulin IgM, który pojawia się w wyniku odpowiedzi organizmu na zakażenie bakterią. Wzrost IgM utrzymuje się do kilku tygodni od zakażenia, z kolei przeciwciała IgG wykrywane są dopiero po ok. 4-6 tygodni od zakażenia. Szczyt wzrostu IgG występuje w okresie od 4 do 6 miesięcy, a ich wysoki poziom utrzymuje się nawet przez wiele lat. Niestety, metody diagnostyki opierające się na reakcjach przeciwciał charakteryzują się niską specyficznością, co jest dostrzegalne szczególnie w początkowej fazie infekcji. Według przeprowadzonych badań test ELISA nie nadaje się na test przesiewowy, a to z tego względu, że daje bardzo duży odsetek wyników fałszywie ujemnych. Tak więc według tego testu niektóre osoby z aktywną infekcją boreliozy mają negatywne wyniki.

Technika Western Blot

Testem o wysokiej swoistości, bez wyników fałszywie pozytywnych i częstszym potwierdzeniem choroby jest, tzw. Western Blot. Western Blot polega na reakcji swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko powierzchniowym antygenom –(flageliny, OspC) o różnej wielkości cząsteczkowej tj. od 18 do 93 kD. Technika Western Blot w badanym materiale, surowicy lub płynie mózgowo-rdzeniowym poszukuje się przeciwciała przeciwko-krętkowe. Dodatni wynik tego testu wskazuje na czynną boreliozę. Może się zdarzyć, że w badanej próbce krwi nie ma oznaczalnych tym testem przeciwciał, wtedy należy badanie powtórzyć nawet kilkakrotnie. Technika ta jest czulsza i bardziej specyficzna niż test ELISA, ponadto Western Blot przeprowadza się, jako test potwierdzenia- w celu wyeliminowania osób z wynikiem fałszywie pozytywnym. Według przeprowadzonych badań sprawdzających czułość techniki Western Blot oceniana jest na 50%-80%, co oznacza, że tą metodą wyniki fałszywie ujemne będą dotyczyły mniejszej grupy chorych. Ponadto, nie ma doniesień o występowaniu wyników fałszywie dodatnich w Western Blot, gdyż techniką tą badane są antygeny charakterystyczne tylko i wyłącznie dla *Borrelia burgdorferi*.

Testy typu Western Blot, (w których wykorzystuje się lizat krętków rozdzielony elektroforetycznie i przeniesionych na membranę) cechują się kilkoma wadami, z których najważniejszy wydaje się brak

bądź niewystarczająca ilość pewnych, ważnych diagnostycznie antygenów, a także obecność dodatkowych mało istotnych diagnostycznie i powszechnie występujących w innych mikroorganizmach antygenów, które to zacierają obraz diagnostyczny w tej metodzie.

W odróżnieniu od testów typu Line i testów opartych na białkach rekombinowanych, antygeny p100, VlsE, p39 i p18 (białko A wiążące dekorynę, DbpA, Osp17) w lizatach komórek *Borrelia burgdorferi* są obecne w niewystarczającej ilości - w największym stopniu dotyczy to antygeny OspC. A to z racji tego, że antygen ten nie jest produkowany lub jest produkowany w nieznacznych ilościach przez szczep *Borrelia burgdorferi* (B31). Szczep ten jest powszechnie wykorzystywany do przygotowania testów diagnostycznych. W związku z tym, mnogość prążków występujących w teście (Western Blot) wykorzystującym lizat może znacznie utrudnić rozróżnienie prążków ważnych z immunologicznego punktu widzenia od prążków powszechnych antygenów (np. białek szoku cieplnego- HSP).

Równocześnie, homologiczne białka pochodzące z różnych genotypów mogą znajdować się w jednym teście, co szczególnie dotyczy wysoko heterogenicznych białek takich jak OspC, VlsE i p18. Jak już wspomniano wcześniej, odpowiedź immunologiczna na poszczególne antygeny krętka boreliozy kształtuje się w zależności od zaawansowania klinicznego choroby. Dzięki przeprowadzonym badaniom, dziś już wiadomo, że we wczesnych fazach (Erythema migrans i neuroborelioza) infekcji boreliozy stwierdzono wysoką reaktywność OspC (22 kDa, p23-25). Razem z p41 białko to jest immunodominującym antygenem wczesnej odpowiedzi (IgM), podczas gdy antygen OspC jest immunodominującym markerem dla wczesnej odpowiedzi immunologicznej, antygeny p100 i p18 są szczególnie dobrymi markerami dla późnej odpowiedzi immunologicznej (klasa IgG).

W diagnostyce laboratoryjnej, produkcja przeciwciał anty VlsE jest wykrywana głównie jako odpowiedź późna (IgG), często poprzedzająca typowe markery IgG wymienione powyżej. Przeciwciała przeciwko różnym homologom p18 są też bardzo ważne dla wczesnej odpowiedzi IgG, w związku, z czym odgrywają również ważną rolę w diagnostyce wczesnej neuroboreliozy.

Test PCR

Badanie to ma za zadanie wyszukać w materiale (np. krew, płyn mózgowo-rdzeniowy) całych i żywych krętków lub ich materiału genetycznego, który pochodzi z nieżywych zdeintegrowanych komórek krętka boreliozy. Metoda ta oparta jest na specyficznym i wybiórczym powielaniu fragmentu DNA bakterii, przez co zaliczana jest do najczulszych metod.

W niektórych przypadkach (ok. 1-2% przypadków) krętki boreliozy można oglądać w preparacie bezpośrednim barwionym specjalną techniką srebrzenia. Niestety, technika ta nie jest specyficzna, przez co nie można odróżnić ,czy są to krętki boreliozy czy inne (np. krętki kiły).

Według zaleceń Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych diagnostyka laboratoryjna każdej postaci boreliozy z Lyme wymaga dwuetapowego protokołu diagnostycznego. Jako pierwszy przeprowadza się test immunoenzymatyczny, dzięki któremu możliwe jest wykazanie obecności swoistych przeciwciał IgM lub IgG, z kolei w drugim etapie diagnostyki boreliozy, należy u chorych z wynikami dodatnimi lub wątpliwymi przeprowadzić oznaczenia techniką Western Blot. Obydwie metody wzajemnie się uzupełniają, ponieważ testy

immunoenzymatyczne cechuje zwykle wysoka czułość i stosunkowo niska swoistość, zaś technika Western Blot charakteryzuje się wysoką swoistością i niższą czułością.

Niestety ze względu na duże trudności diagnostyczne boreliozy, co wiąże się także z brakiem specyficznych objawów chorobowych, bardzo duża grupa osób zakażonych nie otrzymuje leczenia. Szacuje się także, że liczba chorych z nierozpoznaną boreliozą może sięgać nawet kilku milionów osób w Europie.

Helena Kuklik

Źródła:

- Borelioza w praktyce klinicznej, Anna Grzeszczuk, Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL 2010
http://www.borelioza.org/materialy_lyme/bb-diagnostyka.pdf
- Borelioza krok po kroku- poradnik praktyczny dla pacjenta, Piotr Kurkiewicz Listopad 2010r,
<http://lymepoland.com/pliki/poradnik-dr-piotra.pdf>
- Borelioza-choroba groźna, lecz mało znana, dr.n.med Edyta Gałęziowska,
http://www.borelioza.org/artykuly/borelioza_grozna.pdf
- Borelioza z Lyme, Dr hab. Joanna Zajkowska,
http://www.portalwiedzy.pan.pl/images/stories/pliki/UNIWERSYTET_MEDYCZNY/2011/06/07/Poprawiony_teskt_Borelioza.pdf
- Postać stawowa boreliozy z Lyme, Sambor Grygorczuk, Sławomir Pancewicz, Joanna Zajkowska, Maciej Kondrasiuk,
<http://pml.strefa.pl/ePUBLI/144/15.pdf>
- Neuroborelioza, Joanna M. Zajkowska, Teresa Hermanowska-Szpakowicz, Sambor Grygorczuk, Maciej Kondrusik, http://www.borelioza.org/materialy_lyme/praca_zbiorowa-neuroborelioza.pdf
- Diagnostyka i leczenie Boreliozy z Lyme-zalecenia Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych, <http://www.choroby-zakazne.pl/uploads/pdf/borelioza.pdf>