

Ocena wykładników serologicznych zakażenia *B. burgdorferi* u osób zawodowo narażonych na pokłucia przez kleszcze

Analysis of serological markers of Borrelia infection and the risk of developing Lyme disease in forestry workers after years of heavy tick exposure

Ewelina Gowin¹, Jacek Wysocki²

¹ Katedra i Zakład Medycyny Rodzinnej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

² Katedra Profilaktyki Zdrowotnej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

Wstęp. Borelioza jest najczęstszą chorobą przenoszoną przez kleszcze zarówno w Europie jak i w USA. W poniższej pracy poddaliśmy analizie wyniki badań serologicznych w kierunku boreliozy u osób wielokrotnie ukłutych przez kleszcze. Analiza przykładu leśników wsparta danymi z piśmiennictwa ma na celu wyjaśnienie powszechnie funkcjonujących przekonań na temat boreliozy. Badania serologiczne leśników, w kierunku boreliozy, prowadzone były w ramach badań okresowych medycyny pracy w roku 2006, 2008, 2011 i 2012. **Materiał i metody.** Zgodnie z obowiązującymi zaleceniami w roku 2012 wdrożono dwustopniowy schemat diagnostyki: u pacjentów z dodatnimi wynikami przeciwciał w klasie IgG lub IgM przeciwko *Borrelia* oznaczonych metodą ELISA (Enzyme-linked immunoadsorbent assays) wykonywano badanie Western blot. W obserwowanej grupie było 35 pracowników leśnych: trzy kobiety i 32 mężczyzn, w wieku od 24 do 65 lat, średnia wieku 44 lata, mediana 42 lata (SD 10,66, 95%CI 40,17-47,49). **Wyniki.** W 2012 roku 11 osób miało dodatnie wyniki badań serologicznych w kierunku zakażenia *Borrelia burgdorferi*; Western blot był dodatni u 5 z nich: trzy osoby miały objawy typowe dla boreliozy (rumień wędrujący), jedna osoba skarżyła się na niespecyficzne dolegliwości mięśniowo-szkieletowe, a jedna nie zgłaszała dolegliwości. **Wnioski.** Przykład leśników, osób wielokrotnie ukłutych przez kleszcze, a mimo to w większości niechorujących na boreliozę pozwala zilustrować małą przydatność badań serologicznych jako badań przesiewowych w kierunku boreliozy. (*Farm Współ* 2015; 8: 15-20)

Słowa kluczowe: borelioza, leśnicy, markery serologiczne

Summary

Background. In Poland each year many people experience tick bites. Performing serological tests and looking for boreliosis' symptoms leads to over-diagnosing and unnecessary treatment. Aim of the study was an analysis of serological markers of boreliosis and the risk of developing Lyme disease in forestry workers after years of heavy tick exposure. **Material and Methods.** Serological tests for boreliosis were performed in a group of forestry workers as a part of routine occupational medicine tests in 2006, 2008, 2011 and 2012. Serological testing against *Borrelia burgdorferi* with enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) was performed in following years 2008, 2011 and 2012. In 2012 the two-tier analysis was performed: in patients with positive levels of IgM or IgG against *Borrelia* detected by ELISA method, Western blot test was performed. Tests were performed in late autumn, in a period after a maximum tick exposure. **Results.** In the observed group there were 35 forestry workers: three women and 32 men, aged 24 to 65 years, mean age was 44 years. In 2012 eleven patients had positive *B. burgdorferi* serology. Western blot was positive in five of them. Six people had positive IgM titers – two of them were negative in 2011, two patients were IgG positive (one previously negative) and three had positive both antibodies IgG and IgM (also positive in 2011). Western blot confirmed specificity of antibodies in all patients with positive both IgM

and IgG, in one with positive IgG and in one with positive IgM antibodies. Among examined patients seven (20%) declared occurrence erythema migrans in past. **Conclusions.** The example of forestry workers shows that the risk of developing Lyme disease after a tick bite is relatively small. Serological testing is not a useful screening tool for borreliosis. Efforts should be made to educate healthcare providers about indications for Lyme disease testing, particularly that a history of tick bite does not mean the need for testing. (*Farm Współ 2015; 8: 15-20*)

Keywords: lyme disease, forestry workers, serological markers

Wstęp - Ocena wykładników serologicznych zakażenia *B. burgdorferi* u osób zawodowo narażonych na pokłucia przez kleszcze

Borelioza jest najczęstszą chorobą przenoszoną przez kleszcze zarówno w Europie jak i w USA [1,2]. Zapadalności w rejonach endemicznych szacuje się na 20-100/100 000 mieszkańców USA i 100-130/100 000 w Europie [3-5]. Jest znana od połowy lat 70. [4]. Początkowo w USA była rozpoznawana głównie jej postać stawowa. W 1982 roku udało się wyizolować czynnik sprawczy – krętka *Borrelia burgdorferi*. Wówczas okazało się, że ten sam drobnoustrój przenoszony przez kleszcze może być odpowiedzialny za występowanie różnych objawów. Obecnie zidentyfikowano szereg szczepów krętków należących do grupy *B. burgdorferi sensu lato*, ale tylko kilka z nich jest odpowiedzialnych za wystąpienie boreliozy *B. afzelii*, *B. burgdorferi*, *B. garinii*, *B. spielmanii*, *B. bavariensis* [6].

W USA występuje tylko *B. burgdorferi sensu stricto*, który powoduje najczęściej objawy stawowe, rzadziej podostre zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych [1]. Występujący w Europie *B. afzelii* wywołuje głównie postać skórna, natomiast *B. garinii*, powoduje więcej przypadków zajęcia układu nerwowego (klasyczne postaci to limfocytowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, porażenie nerwów czaszkowych, bolesne zapalenie korzeni nerwowych) [6,7]. W Europie wczesne zajęcia ośrodkowego układu nerwowego występuje u 15% nieleczonych osób, po około 5% rozwija sercową lub stawową postać boreliozy [8].

Zakażenia u ludzi wywoływane przez krętka *Borrelia* budzą wiele kontrowersji. Związane jest to głównie z mnogością niespecyficznymi objawów przypisywanych boreliozie oraz powszechnym dostępem do badań serologicznych.

Zgodnie z wytycznymi Polskiego Towarzystwa Chorób Zakaźnych nie zaleca się wykonywania badań serologicznych u pacjentów po pokłuciu przez kleszcze [1,2]. Ale wbrew temu u wielu pacjentów takie badania

są przeprowadzane, a następnie po uzyskaniu wyników dodatnich przypisuje się różnym nieswoistym objawom etiologię boreliozową. Doprowadza to do nadrozpoznawalności boreliozy i prowadzenia niepotrzebnego leczenia.

Z uwagi na trudności w interpretacji badań serologicznych nie można ich stosować jako badań przesiewowych. Badanie to powinno być wykonywane jako test diagnostyczny u pacjentów z podejrzeniem boreliozy, wysuniętym na podstawie prezentowanych objawów klinicznych.

W poniższej pracy poddaliśmy analizie wyniki badań serologicznych w kierunku boreliozy u osób wielokrotnie ukłutych przez kleszcze. Analiza przykładu leśników wsparta danymi z piśmiennictwa ma na celu wyjaśnienie powszechnie funkcjonujących przekonań na temat boreliozy.

Materiał i metody

Badanie serologiczne leśników, w kierunku boreliozy, prowadzone były w ramach badań okresowych medycyny pracy w roku 2006, 2008, 2011 i 2012. Wszyscy uczestnicy byli w dobrym stanie zdrowia, uzyskali zdolność do dalszego wykonywania zawodu. Każdy pacjent poddawany był badaniu lekarskiemu zbierano informacje dotyczące aktualnych dolegliwości oraz chorób występujących w przeszłości, wykonywano także badanie EKG (elektrokardiograficzne).

Z uwagi na długotrwałą ekspozycję każda z osób była w przeszłości wielokrotnie pokłuta przez kleszcze. Badania w latach 2008, 2011 i 2012 prowadzone były przy użyciu testu ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays), w roku 2006 wykonywano przesiewowe badanie na obecności przeciwciał w klasie IgM lub IgG metodą EIA (Enzyme Immunoassay). Badania wykonywano późną jesienią, czyli w okresie po największej ekspozycji na kleszcze.

Zgodnie z obowiązującymi zaleceniami w roku 2012 wdrożono dwustopniowy schemat diagnostyki: u pacjentów z dodatnimi wynikami przeciwciał

w klasie IgG lub IgM przeciwko *Borrelia* oznaczonych metodą ELISA (Enzyme-linked immunoadsorbent assays) wykonywano badanie Western blot.

Wyniki

W obserwowanej grupie było 35 pracowników leśnych: trzy kobiety i 32 mężczyzn, w wieku od 24 do 65 lat, średnia wieku 44 lata, mediana 42lata (SD 10,66, 95%CI 40,17-47,49).

Analizowano wyniki przeciwciał w kierunku *B. burgdorferi* wykonanych w roku 2006, 2008, 2011 i 2012. Liczba pacjentów z dodatnimi wynikami badań serologicznych przedstawiona jest w tabeli I.

W 2012 roku 11 osób miało dodatnie wyniki badań serologicznych w kierunku zakażenia *Borrelia burgdorferi*; Western blot był dodatni u 5 z nich: trzy osoby miały objawy typowe dla boreliozy (rumień wędrujący), jedna osoba skarżyła się na niespecyficzne dolegliwości mięśniowo-szkieletowe, a jedna nie zgłaszała dolegliwości.

Tabela I. Wyniki badań serologicznych w poszczególnych latach

Table I. Number of patients with positive serology in following years

	2008	2011	2012
IgM + IgG-	2	4	6
IgM - IgG+	3	4	2
IgM + IgG+	1	3	3

Sześć osób miało dodatnie przeciwciała w klasie IgM – dwie z nich były ujemne w 2011, dwie osoby były IgG dodatnie (jedna uprzednio ujemna) i trzy miały dodatnie oba IgG i IgM (także dodatnie w 2011). Testem Western blot potwierdzono swoistość przeciwciał u wszystkich pacjentów mających dodatnie przeciwciała w klasie IgM i IgG, u jednego z dodatnim IgG i jednego z dodatnimi przeciwciałami w klasie IgM.

Przesiewowe wyniki badań przeciwciał łącznie w klasie IgG i IgM wykonane w 2006 roku były dodatnie u 16 osób. W badaniu wykonanym dwa lata później u tych samych osób dodatnie przeciwciała w klasie w IgG i IgM miała jedna osoba, dwie osoby miały dodatnie przeciwciała w klasie IgM, a trzy w klasie IgG. U jednej osoby potwierdzono swoistość testem Western blot.

Spośród trzech osób z dodatnimi IgG w 2008, dwie pozostały dodatnie w 2012 potwierdzone dodatnim Western blotem. Obie osoby IgM dodatnie w 2008 były ujemne w 2011, jedna była ponownie dodatnia, w 2012,

ale nie potwierdzono swoistości Western blot. Jedyna osoba z dodatnimi przeciwciałami w klasie IgM i IgG w 2008 pozostała dodatnia do 2012, swoistość przeciwciał potwierdzono testem Western blot.

Spośród dwóch osób IgM i IgG dodatnich w 2011 (ujemne w 2008), jedna była wciąż dodatnia w 2012, z dodatnim Western blot. Spośród dwóch IgG dodatnich w 2011 (ujemnych w 2008), jedna stała się dodatnia w 2012. Wszystkie osoby IgM dodatnie w 2011 (ujemne w 2008), były nadal dodatnie w 2012, jedna miała dodatni Western blot.

Siedem badanych osób (20%) podawało wystąpienie rumienia wędrującego w przeszłości, dwie z nich otrzymały leczenie, mimo tego utrzymywało się dodatnie miano przeciwciał w klasie IgG potwierdzone pozytywnym wynikiem Western blot. Dwie z nich nie zgłosiły się do lekarza w momencie występowania objawów, dlatego nie otrzymały leczenia. W rezultacie uczestnictwa w badaniu, antybiotykoterapię włączono u nich w oparciu o objawy kliniczne i wyniki badań serologicznych.

Czterech pacjentów miało ujemną serologię po leczeniu rumienia wędrującego. Jeden pacjent pozostał IgM dodatni po skutecznym wyleczeniu rumienia wędrującego. Jeden pacjent, u którego skórna postać boreliozy nie była leczona pozostał IgM i IgG dodatni, jeden tylko IgG dodatni, obu pacjentów miało pozytywny Western blot.

Neurologiczna postać choroby z Lyme z klasyczną triadą objawów składającą się z limfocytowego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenia nerwów czaszkowych (np. porażenie nerwu twarzonego), bolesne zapalenie korzeni nerwowych, nie była obserwowane u naszych pacjentów.

Dolegliwości stawowe zgłaszane były przez osiem osób, ale nie stwierdzano cech zapalenia stawów takich jak obrzęk, wzmożone ucieplenie, wysięk w stawie. Jedna z tych osób miała dodatnie miano przeciwciał w klasie IgG potwierdzone pozytywnym wynikiem Western blot.

Inne manifestacje choroby z Lyme takie jak zaburzenia przewodnictwa w obrębie mięśnia sercowego (np. blok trzeciego stopnia) nie były stwierdzane w analizowanej grupie. Wykonane badania EKG nie uwidoczniły nieprawidłowości.

Dyskusja

Pacjenci z opisywanej grupy z uwagi na wykonywany zawód byli wielokrotnie kluci przez kleszcze, ale

tylko nieliczni zgłaszali objawy typowe dla boreliozy. Dla leśników fakt pokłucia przez kleszcze jest zjawiskiem na tyle powszechnym, że nie stanowi powodu zgłoszenia się do lekarza, a tym bardziej wykonywania badań diagnostycznych. O wynikach badań pacjenci dowiadawali się przy okazji badań okresowych.

W analizowanej grupie w oparciu o badanie kliniczne, wywiad dotyczący objawów w przeszłości i serologii, borelioza była rozpoznana u siedmiu osób (20%).

Ryzyko wystąpienia boreliozy po pokłuciu przez kleszcze w populacji ogólnej wynosi około 2% [9]. W naszej grupie ryzyko było wyższe niż w populacji ogólnej – ale w przypadku leśników ekspozycja była duża. Badania eksperymentalne wskazują, że krętki są uwalniane ze światła jelita kleszcza po 24 h od momentu ukłucia gospodarza i migrują w kierunku gruczołów ślinowych w ciągu około 36 h. Zatem wczesne usunięcie kleszcza zapobiega transmisji drobnoustroju. W badaniu szwedzkim wykazano serokonwersję u 64 (6%) spośród 394 pacjentów pokłutych przez zakażone kleszcze, a tylko jedna osoba zgłaszała objawy sugerujące boreliozę, wyniki te wskazują na niskie ryzyko zachorowania na boreliozę po ukłuciu przez zakażonego kleszcza [3]. U większości pacjentów wykazano, zatem bezobjawową serokonwersję [10]. Można, zatem wnioskować, że istnieje możliwość sprawnej eradykacji krętka, bez konieczności leczenia. W badaniu amerykańskim przeprowadzonym przez Nadelman i wsp. u 3,2% osób po pokłuciu przez kleszcze pojawił się rumień wędrujący, nie odnotowano przypadków bezobjawowej serokonwersji [11]. Jednakże z uwagi na wyłączone występowanie *B. burgdorferi* w USA danych tych nie można porównywać do warunków europejskich.

Odsetek zainfekowanych kleszczy jest różny w różnych rejonach świata. W badaniu holenderskim potwierdzono występowanie krętków u 20% badanych kleszczy, w badaniu szwajcarskim u 10% [12]. Trudno jednak uzyskać obiektywne dane, bo analizie podlegają kleszcze tylko od osób, które zgłosiły się o pokłuciu do lekarza.

Według European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis (EUCLAB) badania serologiczne są zalecane tylko w razie silnego prawdopodobieństwa wystąpienia choroby wysuniętego na podstawie objawów prezentowanych przez pacjenta, nie zaleca się wykonywania badań tylko ze względu na dodatni wywiad dotyczący pokłucia przez kleszcze [1].

Postępowanie w przypadku rumienia wędrującego

W analizowanej grupie, po wykonaniu badań serologicznych oraz w oparciu o występowanie objawów klinicznych u dwóch osób wdrożono leczenie. Byli to pacjenci, u których w przeszłości wystąpił typowy rumień, ale nie zostało włączone leczenie.

Gdyby ci pacjenci zgłosili się do lekarza w momencie występowania rumienia wędrującego, można byłoby rozpoznać chorobę i rozpocząć leczenie na podstawie objawu bez konieczności potwierdzenia serologicznego.

Skórna manifestacja boreliozy występuje u około 80-90% pacjentów z infekcją o etiologii *B. burgdorferi* [13]. Zatem słuszne jest zalecenie, aby u osób prezentujących rumień o średnicy > 5cm rozpoznawać boreliozę tylko w oparciu o objawy kliniczne i wdrażać stosowne leczenie, bez konieczności wykonywania badań serologicznych. W przypadku rumienia wędrującego pojawiającego się około 3-30dni po ukłuciu przez kleszcza, badania serologiczne są mało przydatne, a oczekiwanie na ich wyniki opóźnia terapię.

W badanej grupie leczenie rumienia wędrującego nie miało wpływu na obecność przeciwciał: u trzech pacjentów leczonych z powodu rumienia wędrującego utrzymywały się dodatkowo miana swoistych przeciwciał: u dwóch w klasie IgG, u jednej w klasie IgM, u czterech osób leczonych z powodu rumienia w przeszłości nie wykazano obecności przeciwciał, u jednej osoby nielezionej obecne były swoiste przeciwciała w klasie IgM i IgG. Nawet po skutecznej antybiotykoterapii przeciwciała mogą pozostać dodatkowo przez długi czas, a w innych przypadkach może nie dojść do serokonwersji [14]. Utrzymywanie się przeciwciał mimo leczenia nie jest powodem do kontynuacji terapii. Ocena poziomu przeciwciał nie jest przydatna w celu monitorowania skuteczności leczenia. Analiza efektywności terapii musi opierać się na ustąpieniu objawów klinicznych choroby.

W późniejszych stadiach choroby z Lyme zajęcie stawów jest równie częste jak zajęcie mięśnia sercowego, dotyczy około 10% chorujących osób. Zapalenie jednostawowe zwykle występuje w obrębie dużych stawów (staw kolanowy, łokciowy) [14,15]. Osiem spośród badanych osób deklarowało występowanie dolegliwości stawowych, ale nie stwierdzono żadnego przypadku pełnoobjawowego zapalenia stawów.

W badanej grupie nie obserwowano żadnych przypadków rozsianych postaci boreliozy. Można to

przypisać szybkiemu włączeniu leczenia na etapie zmian skórnych.

Boreliozie przypisywany jest szereg niespecyficznych objawów. Gorączka, bóle mięśniowe, ból głowy, osłabienie są zwykle nieswoistą manifestacją odpowiedzi zapalnej na obecność bakterii. Mogą towarzyszyć aktywnej postaci boreliozy stawowej lub neuroboreliozy. Ale samodzielne występowanie tego rodzaju objawów nie może sugerować rozpoznania boreliozy [16].

Fałszywie dodatnie wyniki

W badanej grupie u trzech osób obserwowano dodatni wynik przeciwciał w klasie IgM stwierdzany dwukrotnie w odstępie roku, przy braku objawów klinicznych, ujemnym wyniku przeciwciał w klasie IgG i ujemnym Western blot. Można je zatem uznać za wynik fałszywie dodatni.

Obserwowane długotrwałe utrzymywanie się tylko przeciwciał w klasie IgM nie jest uważane za wykładnik aktywnej choroby, lecz za wynik fałszywie dodatni [17]. Fałszywie dodatnie wyniki przeciwciał przeciwko *Borrelia* występują powszechnie w sytuacji stymulacji limfocytów B u pacjentów z toczniem układowym, w przypadku zapalenia wsierdza oraz w wielu infekcjach np. o etiologii EBV, parwowirusowej w przypadku malarii [18]. W przypadku otrzymania dodatnich wyników przeciwciał metodą ELISA zalecane jest prowadzenie dwustopniowej diagnostyki. W celu weryfikacji dodatnich wyników w teście ELISA przeprowadza się badanie swoistości przeciwciał przy użyciu metody Western blot. Na podstawie analizy statystycznej wyników badań uzyskanych od pacjentów chorujących na boreliozę ustalono kryteria interpretacji testu Western blot. W przypadku ostrej fazy choroby, o okresie trwania objawów poniżej 4 tyg. można polegać na ocenie przeciwciał w klasie IgM – wynik jest dodatni w momencie występowania dwóch z trzech swoistych prążków (p23, p39, p41). W przypadku objawów trwających powyżej 4tyg należy opierać się na ocenie przeciwciał w klasie IgG – dla których dodatni wynik testu Western blot oznacza występowanie pięciu spośród 10 swoistych prążków (p18, 23, 28, 30, 39, 41, 45, 58, 66, 93). Większość przypadków serokonwersji jest bezobjawowa [18]. W przypadku chorób autoimmunologicznych także wynik Western blot w klasie IgM może być fałszywie dodatni.

Badacze belgijscy podjęli się oceny zestawów badań przesiewowych w kierunku boreliozy czterech różnych

producentów i 10 testów potwierdzenia. Swoistość testów oceniających przeciwciała w klasie IgG była akceptowalna dla wszystkich testów, w klasie IgM wykazano więcej wyników fałszywie dodatnich [7].

W teście Western blot było więcej wyników fałszywie dodatnich dla przeciwciał IgM, związane jest to z doбором antygenów [19]. Najczęściej fałszywie dodatnie były przeciwciała przeciwko OspC Bga, p41 i Osp 17. Przeciwciała przeciwko p41 wykazują wiele reakcji krzyżowych, stąd obecnie wielu producentów rezygnuje z jego zastosowania, lub korzysta z p41.

Niemiecka DGHM rekomenduje zastosowanie następujących antygenów: p39, OspC, DbpA (Osp17) dla IgM oraz p41int, p39, p83/100, Osp C, p58, DpA(Osp17) i VisE dla IgG. Z uwagi na sąsiedztwo geograficzne dla Polski zalecenia niemieckie są bardziej użyteczne niż amerykańskie. Trwają starania, aby ujednoczyć zestaw antygenów stosowanych przez różnych producentów w Europie.

Przetrwałe izolowane podwyższenie przeciwciał w klasie IgM

Dodatnie wyniki przeciwciał w klasie IgM są powszechnie obserwowane, w populacji amerykańskiej nawet 50% pacjentów wykazuje dodatnie przeciwciała w klasie IgM, często o potwierdzonej swoistości w testach Western blot [2]. Dlatego CDC u pacjentów z objawami trwającymi powyżej czterech tygodni zaleca wykonywanie dwustopniowej diagnostyki tylko w klasie IgG. W raporcie opublikowanym przez Cottle i wsp. wykazano, że większość pacjentów skierowanych do poradni chorób zakaźnych w Liverpoolu (UK) z podejrzeniem boreliozy, w rzeczywistości na nią nie chorowała [4,20].

Podsumowanie

W Polsce w sezonie wiosenno-jesiennym występuje powszechna ekspozycja na kleszcze. Każdego roku wiele osób zostaje pokłutych przez kleszcze. Wykonywanie badań serologicznych, a następnie poszukiwanie objawów chorobowych doprowadza do nadrozpoznawalności boreliozy i wdrażania niepotrzebnego leczenia. Przykład leśników, osób wielokrotnie ukłutych przez kleszcze, a mimo to w większości niechorujących na boreliozę pozwala zilustrować małą przydatność badań serologicznych jako badań przesiewowych w kierunku boreliozy.

Konflikt interesów / Conflict of interest

Brak/None

Adres do korespondencji:

✉ Ewelina Gowin

Katedra i Zakład Medycyny Rodzinnej

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

ul. Przybyszewskiego 39; 60-355 Poznań

☎ (+48 61) 869 11 47

✉ ewego@poczta.onet.pl

Piśmiennictwo

1. Stanek G, Wormser G, Gray J i wsp. Lancet 2012;379:461-73. European Concerted Action on Lyme Borreliosis (EUCALB). Welcome to EUCALB.com! An information resource of the ESCMID study group, ESGBOR. Available from: <http://meduni09.edis.at/eucalb...>
2. Charini WA, Medoff G i wsp. Final report of the Lyme disease review panel of the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2010;51:1-54.
3. Berglund J, Eitrem R, Ornstein K i wsp. An epidemiologic study of Lyme disease in southern Sweden. N Engl J Med 1995;333:1319-27.
4. Cottle LE, Mekonnen E, Beadsworth MB i wsp. Lyme disease in a British referral clinic. QJM 2012; 10.1093/qjmed/hcs003published online Feb 1.2.
5. Huppertz HI, Böhme M, Standaert SM i wsp. Incidence of Lyme borreliosis in the Würzburg region of Germany. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999;18:697-703.
6. Fingerle V, Schulte-Spechtel UC, Ružić-Sabljić E i wsp. Epidemiological aspects and molecular characterization of Borrelia burgdorferi sl from southern Germany with special respect to the new species Borrelia spielmanii sp . Int J Med Microbiol 2008;298:279-90.
7. Kesteman T, Rossi C, Bastien P i wsp. Prevalence and genetic heterogeneity of Borrelia burgdorferi sensu lato in Ixodes ticks in Belgium. Acta Clin Belg 2010;6:319-22.
8. Hengge UR, Tannapfel A, Tyring SK i wsp. Lyme borreliosis. Lancet Infect Dis 2003;3:489-500.
9. Hilton E, DeVoti J, Benach JL i wsp. Seroprevalence and seroconversion for tick-borne diseases in a high-risk population in the northeast United States. Am J Med 1999;106:404-9.
10. Fryland L, Wilhelmsson, Lindgren P i wsp. Low risk of developing Borrelia burgdorferi infection in the south-east of Sweden after being bitten by a Borrelia burgdorferi-infected tick. Int J Infect Dis 2011;15:174-81.
11. Nadelman RB, Nowakowski J, Fish D i wsp. Prophylaxis with single dose doxycycline for the prevention of Lyme disease after an Ixodes scapularis tick bite. N Engl J Med 2001;345:79-84.
12. Stanek G, Fingerle V, Hunfeld KP i wsp. Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. Clin Microbiol Infect 2011;17:69-79.
13. Aguero-Rosenfeld ME, Nowakowski J, Bittker S i wsp. Evolution of the serologic response to Borrelia burgdorferi in treated patients with culture-confirmed erythema migrans. J Clin Microbiol 1996;34:1-95.
14. Wormser GP, Dattwyler RJ, Shapiro ED i wsp. The clinical assessment, treatment, and prevention of Lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2006;43:1089-134.
15. Mygland A, Ljøstad U, Fingerle V i wsp. EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. Eur J Neurol 2010;17:8-16.
16. Branda JA, Aguero-Rosenfeld ME, Ferraro MJ i wsp. 2-tiered antibody testing for early and late Lyme disease using only an immunoglobulin G blot with the addition of a VlsE band as the second-tier test. Clin Infect Dis 2010;50:2006.
17. Steere AC, McHugh G, Damle N i wsp. Prospective study of serologic tests for Lyme disease. Clin Infect Dis 2008;47:188-95.
18. Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U i wsp. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. FEMS Immunol Med Microbiol 2007;49:13-21.
19. Flisiak R, Pancewicz S. Diagnostyka i leczenie Boreliozy z Lyme, Zalecenia Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych. Przegl Epidemiol 2008;62:193-9.
20. Aucott J, Morrison C, Munoz B i wsp. Diagnostic challenges of early Lyme disease: lessons from a community case series. BMC Infect Dis 2009;9:79.