



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

EPIDEMIOLOGÍA DE LA BORRELIOSIS DE LYME: ANÁLISIS DE LA CONTRIBUCIÓN DE RESERVORIOS Y VECTORES AL MANTENIMIENTO DE LOS FOCOS

Autora

Blanca Martínez Abós

Director

Dr. Agustín Estrada Peña

Facultad de Veterinaria de Zaragoza
2015

1. Índice.

○ Resumen (castellano e inglés).....	3-4
○ Introducción	5-7
○ Justificación y objetivos	7-8
○ Material y métodos	9-11
○ Resultados y discusión	12-21
○ Conclusiones (castellano e inglés)	22
○ Valoración personal	23
○ Referencias	24-26

2. Resumen.

Los focos naturales de garrapatas, patógenos y reservorios vertebrados muestran complejas relaciones que son cruciales en su circulación. Sin embargo, los estudios existentes son incompletos o realizados a pequeñas escalas espaciales, sin hacer una aproximación holística. En este estudio se ha aplicado la metodología de redes para comprender cómo se sustentan los focos naturales, estudiando la red de reservorios y garrapatas, y sus índices de centralidad e importancia relativa de los nodos, que permiten la existencia de focos de borreliosis de Lyme en EEUU.

Estas redes naturales están muy estructuradas, son modulares, coherentes, y anidadas en cierto grado. Los resultados que aportamos en este estudio, demuestran que estas redes se sustentan mediante la existencia de un amplio número de hospedadores que contribuyen al mantenimiento de los focos, a la circulación del patógeno y a la dispersión de los vectores a través de la red de hospedadores. Los focos de borreliosis de Lyme en EEUU están mantenidos por varias especies de garrapatas, aunque tan solo dos de ellas parecen ser capaces de transmitir la infección a la especie humana. Sin embargo, la existencia de múltiples especies de reservorios, y las garrapatas que pueden actuar como “puentes” uniendo grupos ecológicos de reservorios, facilitan la circulación del patógeno y su alta persistencia en los focos naturales.

La metodología que se ha utilizado en este trabajo supone una nueva aproximación a situaciones epidemiológicas transmitidas por vectores, que pueden ser tratadas de una forma cuantitativa, valorando la contribución de cada componente de la red y averiguar cuáles son los componentes más frágiles (y más susceptibles de intervención para su control) o aquellos que permiten la mayor circulación del patógeno.

Abstract

Epidemiology of the Lyme borreliosis : analysis of the reservoir and vector competence to the sustainability of foci.

Natural foci of ticks, pathogens, and vertebrate reservoirs display complex relationships that are key to their circulation through the landscape, without considering the holistic concept of these foci. However, studies are commonly incomplete or performed at small spatial scales. Here, we applied the webs methodology to understand how the networks of reservoirs and vectors support the existence of foci of Lyme borreliosis in USA, capturing the indexes of centrality and relative importance of each node.

These natural networks are highly structured, are modular, coherent, and nested in some degree. The results provided in this study demonstrated that the large number of vertebrates in the

network contributes to the support of foci, the circulation of the pathogen and the spread of the vectors through the network of hosts. The foci of Lyme borreliosis in the USA are supported by several species of ticks, but only two of them seem to be able to transmit the infection to humans. However, the existence of multiple species of reservoirs, and ticks that can act as "bridges" linking reservoirs ecological groups, facilitate the movement of the pathogen and its high persistence in the natural foci.

The methodology used in this work is a new approach to vector-borne epidemiological situations, which can be treated in a quantitative way, evaluating the contribution of each component of the network and examining the weakest nodes (and most likely adequate for control) or those that allow greater circulation of the pathogen.

3. Introducción.

Las garrapatas, sus hospedadores, y los patógenos a los que mantienen constituyen una comunidad de organismos que interactúan y forman focos naturales. Estos patógenos tienen una conocida importancia en la salud animal y humana (Patz et al, 2005), son ejemplos de complejidad ecológica (Ostfeld et al, 2005), y son el paradigma de la existencia de abanicos vectores generalistas y especialistas que se asocian para producir focos permanentes de infección. Dada la ubicuidad de estas asociaciones, es necesario comprender los factores que generan, mantienen y las dirigen. Este estudio tiene implicaciones tanto en la ecología aplicada como en la diseminación de enfermedades infecciosas, el peligro para la salud pública, y como base para comprender los factores que mantienen la coherencia de estos focos. Es también el punto de partida para los estudios que pretenda asociar la tendencia del clima con los posibles impactos en la salud humana, mediante las interacciones con los reservorios, los hospedadores y los vectores.

Los focos de garrapatas y patógenos transmitidos están regulados tanto por un grupo de factores ambientales apropiados para la supervivencia de los vectores, como por la abundancia e idoneidad de los vertebrados, que son los reservorios para la circulación del patógeno (Randolph y Rogers, 2010). Es decir, las garrapatas dependen de unas condiciones climáticas adecuadas para completar su ciclo vital. De la misma forma, los patógenos dependen de un umbral crítico en la abundancia de las garrapatas para poder circular dentro de los ciclos de transmisión. Además, las interacciones bióticas, en las que las garrapatas encuentran un vertebrado en el que alimentarse, transmitir el patógeno, y vehicularlo así a la siguiente generación de vectores, exigen una estrecha asociación en el espacio con los vertebrados reservorios. Estas interacciones resultan en una combinación espacial de componentes que son variables espacialmente, es decir, que no son siempre los mismos en cada zona. Estas combinaciones de factores condicionan, bien la extinción del foco, bien su amplificación (Keesing et al, 2010; Ostfeld y Keesing, 2000; Shaw et al, 2003).

La borreliosis de Lyme es uno de los procesos transmitidos por garrapatas que ha sido más estudiado, a pesar de que las primeras citas de casos datan de los años 80 del siglo XX. En la figura 1 se indica el ciclo vital de forma generalizada para una especie de garrapata. Los adultos de este vector se nutren en grandes ungulados, tras lo cual la hembra pone algunos miles de huevos. Aunque la hembra esté infectada con las espiroquetas responsables de la infección, estas no se transmiten a los huevos (no existe transmisión transovárica). Las larvas que eclosionan de estos huevos se alimentan sobre pequeños roedores o aves, de forma que ya pueden infectarse tras la alimentación en reservorios que ya pueden estar infectados. Las larvas alimentadas mudan y son, o bien capaces de transmitir la infección a un nuevo grupo de reservorios sanos, o bien infectarse (si no lo estaban) tras la alimentación en estos vertebrados. Normalmente, las ninfas son el estadio que

más comúnmente se asocia con la transmisión a la especie humana, no por una afinidad de este estadio a picar al hombre, sino por su pequeño tamaño, que hace que no sea advertida y retirada por las personas a las que está picando.

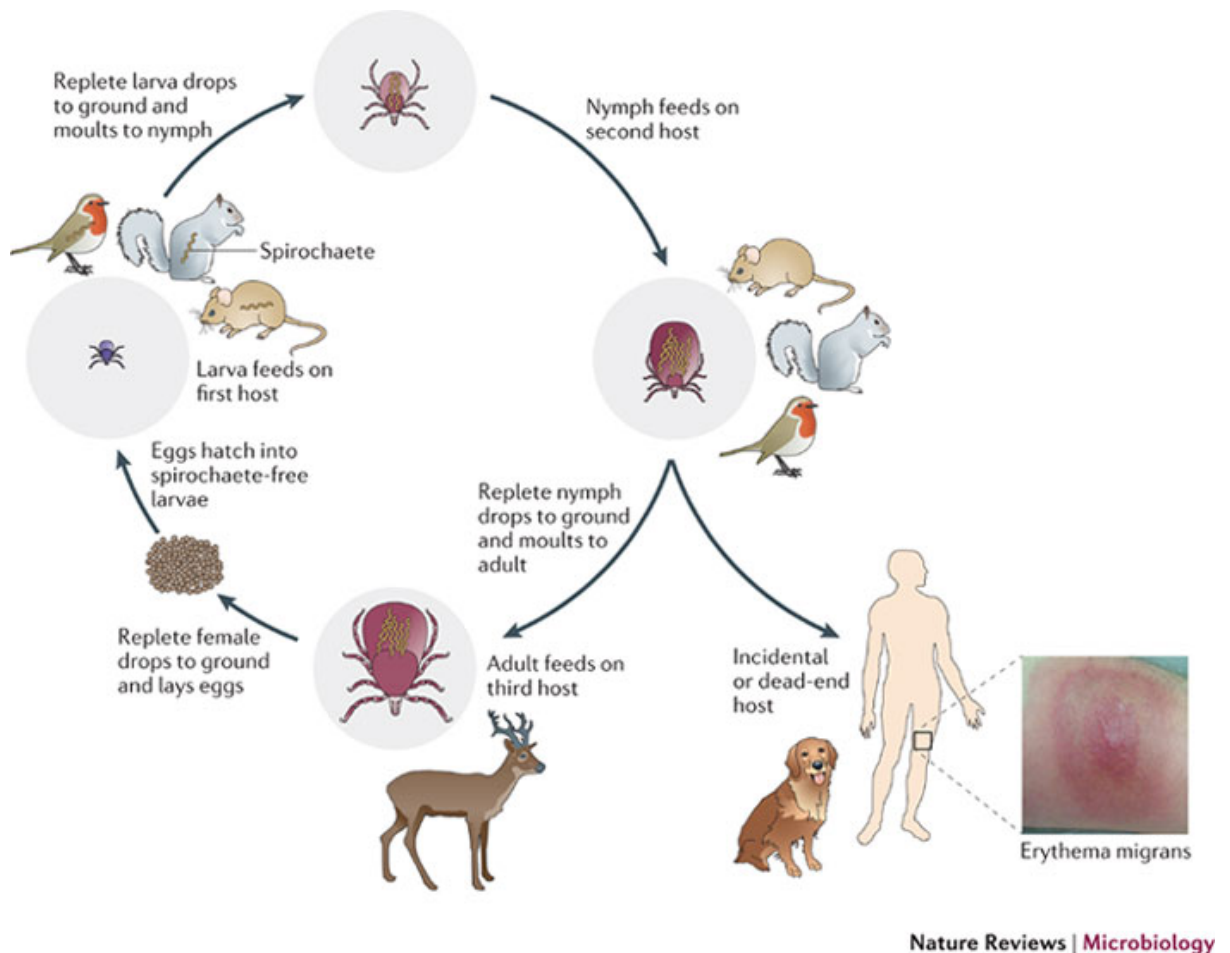


Figura 1: reconstrucción simplificada del ciclo de una garrapata del género *Ixodes* y su papel en la transmisión de *Borrelia* spp. La imagen ha sido obtenida de Radolf et al. (2012).

La teoría de redes se ha venido utilizando para investigar las interacciones ecológicas entre especies (Anderson y Sukhdeo, 2011; Parker et al, 2003). Estas aproximaciones proporcionan un marco útil para comprender los patrones estructurales y los papeles funcionales de las especies en los ecosistemas (Bersier et al, 2002; Clauet et al, 2008). Las redes de parásitos apenas se han estudiado mediante estos métodos, y han existido escasos intentos de usar la topología de la comunidad de hospedadores para describir la dinámica parasitaria (Hernandez y Sukhdeo, 2008; Lafferty et al, 2008; Rudolf y Lafferty, 2011). Es muy posible que la escasez de estudios en este campo venga propiciada por la necesidad de trabajar con datos de naturaleza taxonómica. Este tipo

de referencias están siempre sujetas a cierta desviación en la colección y análisis de los mismos, normalmente porque algunos hospedadores son más abundantes, y por lo tanto más fáciles de coleccionar, bien por los intereses particulares de investigación del grupo de trabajo, bien por el entorno geográfico en el que se realiza el estudio. Este tipo de meta-análisis necesita solidez y homogeneidad en los datos que sirven de base para todos los desarrollos posteriores por lo que se precisan grandes bases de datos, normalmente recopiladas de la literatura científica, para poder aplicar métodos sólidos al manejo de los datos.

4. Justificación y objetivos.

Nuestro objetivo ha sido comprender la red epidemiológica de la Borreliosis de Lyme en el territorio de Estados Unidos de América, valorar las garrapatas implicadas en su mantenimiento y comprender el papel de los diferentes reservorios vertebrados. Para ello hemos recopilado datos de la literatura científica en el periodo 1995-2014, que han sido analizados mediante los métodos de la teoría de redes. Para comprender el funcionamiento de la red epidemiológica se han usado los índices de la topología de redes, que se explicarán en el capítulo siguiente.

La elección del patógeno ha estado basada en la inmensa importancia que tiene para la salud pública (con más de 300.000 casos anuales solamente en EEUU). Aunque ciertos estudios de campo se han centrado en estudios similares con otros vectores a un nivel puramente local (Krasnov et al, 2007; Wells et al, 2013), no se han identificado los mecanismos centrales que rigen los fenómenos de circulación de patógenos entre garrapatas y reservorios, necesarios para comprender los factores que regulan su circulación. El marco geográfico ha sido elegido por la enorme cantidad de datos que se ha acumulado en los últimos 15 años, fruto del interés por comprender la epidemiología de la enfermedad. Este interés ha producido un alto número de publicaciones, con la alta cantidad de datos necesarios para abordar un meta-análisis de este tipo, en el que la calidad y la abundancia de registros es imprescindible para conocer la dinámica de un sistema complejo.

De forma detallada, los Objetivos se han centrado:

- Reunir la información sobre las garrapatas, los agentes patógenos y los reservorios vertebrados reportados en los focos de Borreliosis de Lyme en EEUU. El periodo del estudio se ha restringido al periodo 1995-2014 por la dificultad de obtener datos adecuados de identificación del patógeno antes de la fecha inferior (ausencia de estudios basados en el ADN).
- Producir una red ecológica con tales registros.

- Obtener los índices de la topología de la red, que proporcionan los valores de centralidad y de importancia relativa de cada uno de los nodos (organismos) que conforman la red. Calcular los agrupamientos (“clusters”) de especies y su circulación en la naturaleza.
- Obtener las conclusiones epidemiológicas necesarias de estos resultados.

5. Material y Métodos.

Una red consiste en nodos y uniones, que se usan para representar los componentes de un sistema (los nodos) y las relaciones entre ellos (las uniones). De la misma forma que una red alimentaria describe “quién come a quién” en términos ecológicos (Cattin et al, 2004), nuestra aplicación describe “quién es parásito de quién”, “quién es el reservorio de qué”, y “quién transmite qué” en términos de garrapatas, vertebrados y patógenos. Cada nodo representa una especie, y la unión entre dos nodos indica qué garrapata se ha encontrado sobre qué hospedador. Nuestra unidad de trabajo ha sido el “registro”, que se define aquí como el número de veces que un patógeno o una garrapata han sido citados en un hospedador. El número total de registros proporciona el balance de estas asociaciones, que están sin duda desviadas por las preferencias de los investigadores a muestrear en un territorio determinado o a coleccionar los hospedadores más comunes. El número de registros fue procesado pues para evitar esta desviación, utilizando métodos basados en estadística multivariante señalados anteriormente como adecuados (Estrada-Peña et al., 2015). Este balance de los datos permite calcular las medidas de centralidad de la red (ver más adelante).

Se estableció una serie de filtros para mejorar la calidad de la información y evitar la introducción de datos que podrían ser erróneos y contribuir a falsear los índices obtenidos. Así, los registros sin determinación específica de cualquiera de los agentes fueron eliminados, lo que también eliminó los datos obtenidos mediante serología (siguiendo a Ostfeld et al, 2005). Los datos serológicos pueden dar lugar a reacciones cruzadas frente a diversas geno-especies del patógeno, y por lo tanto, contribuir a “introducir ruido” en los datos finales. Tampoco se consideraron los registros en los que el patógeno había sido detectado en una garrapata mientras se alimentaba sobre su hospedador, porque es imposible decidir si el patógeno estaba en el vertebrado (y la garrapata lo había ingerido pero era incapaz de transmitirlo) o si la garrapata ya estaba infectada antes de la ingesta de sangre (Randolph et al, 2010). Se eliminaron de la misma forma los registros procedentes de hospedadores humanos o de animales domésticos, porque se trata de asociaciones casuales, que no son específicas.

La tabla 1 muestra un ejemplo de la forma en que se agruparon los datos, teniendo que cada fila en la tabla corresponde, a modo de ejemplo, con un “registro”. Es decir, la presencia de un patógeno en un reservorio o un vector, o el hallazgo de un vector sobre un hospedador.

Tabla 1. Un ejemplo con 26 registros (de los 1144 de los que consta la tabla final) en el que muestra la combinación de “Destino” (el hospedador, el reservorio o el vector) y el “Origen” (el vector o el patógeno) junto con algunas columnas auxiliares que contienen detalles taxonómicos, como la Familia y el Orden del reservorio, para cálculos posteriores.

Destino	Origen	Familia	Orden
<i>Catharus ustulatus</i>	<i>Ixodes affinis</i>	Turdidae	Passeriformes
<i>Neotoma floridana</i>	<i>Ixodes affinis</i>	Cricetidae	Rodentia
<i>Odocoileus virginianus</i>	<i>Ixodes affinis</i>	Cervidae	Artiodactyla
<i>Peromyscus gossypinus</i>	<i>Ixodes affinis</i>	Cricetidae	Rodentia
<i>Thryothorus ludovicianus</i>	<i>Ixodes affinis</i>	Certhiidae	Passeriformes
<i>Anolis carolinensis</i>	<i>Borrelia andersonii</i>	Iguanidae	Squamata
<i>Anolis carolinensis</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Iguanidae	Squamata
<i>Aythya collaris</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Anatidae	Anseriformes
<i>Aythya collaris</i>	<i>Borrelia lonestari</i>	Anatidae	Anseriformes
<i>Anas platyrhynchos</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Anatidae	Anseriformes
<i>Clethrionomys gapperi</i>	<i>Ixodes angustus</i>	Cricetidae	Rodentia
<i>Anas platyrhynchos</i>	<i>Borrelia lonestari</i>	Anatidae	Anseriformes
<i>Anolis sagrei</i>	<i>Borrelia bissettii</i>	Iguanidae	Squamata
<i>Anolis sagrei</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Iguanidae	Squamata
<i>Aix sponsa</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Anatidae	Anseriformes
<i>Glaucomys sabrinus</i>	<i>Ixodes angustus</i>	Sciuridae	Rodentia
<i>Glaucomys sabrinus</i>	<i>Ixodes angustus</i>	Sciuridae	Rodentia
<i>Microtus californicus</i>	<i>Ixodes angustus</i>	Cricetidae	Rodentia
<i>Microtus californicus</i>	<i>Ixodes angustus</i>	Cricetidae	Rodentia
<i>Microtus montanus</i>	<i>Ixodes angustus</i>	Cricetidae	Rodentia
<i>Mus musculus</i>	<i>Ixodes angustus</i>	Muridae	Rodentia
<i>Neotoma fuscipes</i>	<i>Ixodes angustus</i>	Cricetidae	Rodentia
<i>Neotomafuscipes</i>	<i>Ixodes angustus</i>	Cricetidae	Rodentia
<i>Peromyscus californicus</i>	<i>Ixodes angustus</i>	Cricetidae	Rodentia
<i>Peromyscus maniculatus</i>	<i>Ixodes angustus</i>	Cricetidae	Rodentia
<i>Branta canadensis</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Anatidae	Anseriformes

Una red no es tan solo una colección de figuras geométricas. La red tiene unas propiedades matemáticas, que pueden analizar y evaluar la importancia de cada nodo en la circulación (a través de las uniones) de los demás elementos de la red (Estrada-Peña et al, 2015). Las medidas de centralidad implican que existen nodos que están significativamente más unidos al resto de la red que otros. Esos nodos son los “super-conductores” o “super-dispersadores” porque son los que mejor permiten la circulación del patógeno (Kourtellis et al, 2013). Hemos calculado dos medidas de

centralidad que permiten evaluar el comportamiento de los “super-dispersadores”. Dos de ellas son el índice llamado “PageRank” (PR) y el índice llamado “Betweenness” (B). El primero asigna un valor a cada nodo basándose en la importancia de los nodos que se unen a ese nodo. El segundo proporciona un valor de la frecuencia en la que un nodo se encuentra interconectando otros nodos. La importancia implícita en nuestra aplicación es que un nodo con altos valores de B y PR intervendrá de forma decisiva en la circulación de los patógenos o en el mantenimiento de las garrapatas en los focos naturales. Se ha calculado finalmente el índice “Strenght” (S) que mide la fuerza con la que una especie (bien sea de garrapata, repertorio o patógeno) está unida al resto de la red, teniendo en cuenta el número de citas ponderadas sobre el total de registros mediante métodos desarrollados anteriormente (Estrada-Peña et al., 2015).

Las redes tienden a estructurarse en aglomeraciones (“clusters”) en las que algunos nodos están fuertemente asociados, y más separados del resto de nodos (Blondel et al, 2008; Fortuna et al, 2010). En los sistemas biológicos, el anidamiento se corresponde con la presencia de sub-redes, que se encuentran incluidas dentro de la red general. Es decir, se trata de pequeñas redes de especialistas que se engloban dentro de la red de generalistas. Hemos calculado el anidamiento de la red utilizando los métodos de Guimaraes y Guimaraes (2006). Estos datos indican una alta afinidad ecológica entre los nodos que componen cada uno de los agrupamientos. Todos los cálculos preliminares se llevaron a cabo con el paquete igraph (Csardi y Nepusz, 2006) para el entorno de desarrollo R (R Core Team, 2014). La red se ensambló, estudió y visualizó con el entorno Gephi (<http://gephi.github.io>, accedida en Enero de 2015), usando el algoritmo ForceAtlas2 (Jacomy et al, 2012). Todos los índices mencionados anteriormente se calcularon también en este entorno.

6. Resultados y Discusión

La Figura 2 muestra los resultados de analizar los datos de un total de 1144 registros de asociaciones de garrapatas, reservorios y patógenos relacionadas con la borreliosis de Lyme en EEUU, y procedentes de unas 250 referencias bibliográficas. Estos datos se expresan en forma de red según el algoritmo ForceAtlas2, que recurre al análisis de las relaciones tróficas entre vectores, reservorios y patógenos para producir la “disposición más sólida” entre los actores que intervienen en la red. El algoritmo de agrupamiento ha detectado un total de 5 grupos o “clusters” que aparecen con diferentes colores. Cada nodo (círculos que representan una especie diferente) se ha dibujado con un tamaño proporcional a su índice B, mientras que el tamaño de las etiquetas es proporcional a su índice PR. La Tabla 2 incluye estos mismos datos en forma numérica, para una mejor comparación de los relaciones entre los organismos (los nodos) que componen la red. Se trata de una red con una alta modularidad y una baja densidad (0,006 en el rango 0-1). Esto significa que existe un alto número de especies de reservorios que pueden permitir la circulación tanto de los vectores como de los patógenos, que la red no se restringe a unos hospedadores-reservorios-vectores, y que de esta forma la capacidad de dispersión es muy alta.

La red está mantenida por 19 especies de garrapatas (*Ixodes affinis*, *I. angustus*, *I. auritulus*, *I. baergi*, *I. brunneus*, *I. cookei*, *I. dentatus*, *I. hearlei*, *I. jellisoni*, *I. kingi*, *I. marxi*, *I. minor*, *I. ochotona*, *I. pacificus*, *I. scapularis*, *I. sculptus*, *I. spinipalpis*, *I. texanuse* *I. woodi*). Sin embargo, varias de estas especies no tienen una gran importancia dentro de la red y su hallazgo sobre algunos de los reservorios puede ser un hecho casual, según los datos que se desprenden de la estructura de la red. Hasta la fecha, las espiroquetas del género *Borrelia* se han encontrado de forma incontestable en *I. affinis*, *I. auritulus*, *I. dentatus*, *I. pacificus* e *I. scapularis*, que son las especies que tienen una mayor importancia dentro la red epidemiológica, es decir que las especies de garrapatas que tienen un abanico de hospedadores con mayor valor de los índices PR y B. Es interesante destacar los altos valores del índice B encontrados para las dos principales especies de garrapatas que transmiten la infección en EEUU, es decir, *I. pacificus* e *I. scapularis*. Las otras especies de garrapatas parecen tener una importancia puramente residual, y simplemente están asociadas a las redes de hospedadores que mantienen a las garrapatas principales en la transmisión del patógeno. De la misma forma, es necesario mencionar que solamente las garrapatas que intervienen en la circulación del patógeno tienen un valor del índice B mayor de cero, lo que demuestra la idoneidad del método para acometer estudios de redes epidemiológicas.

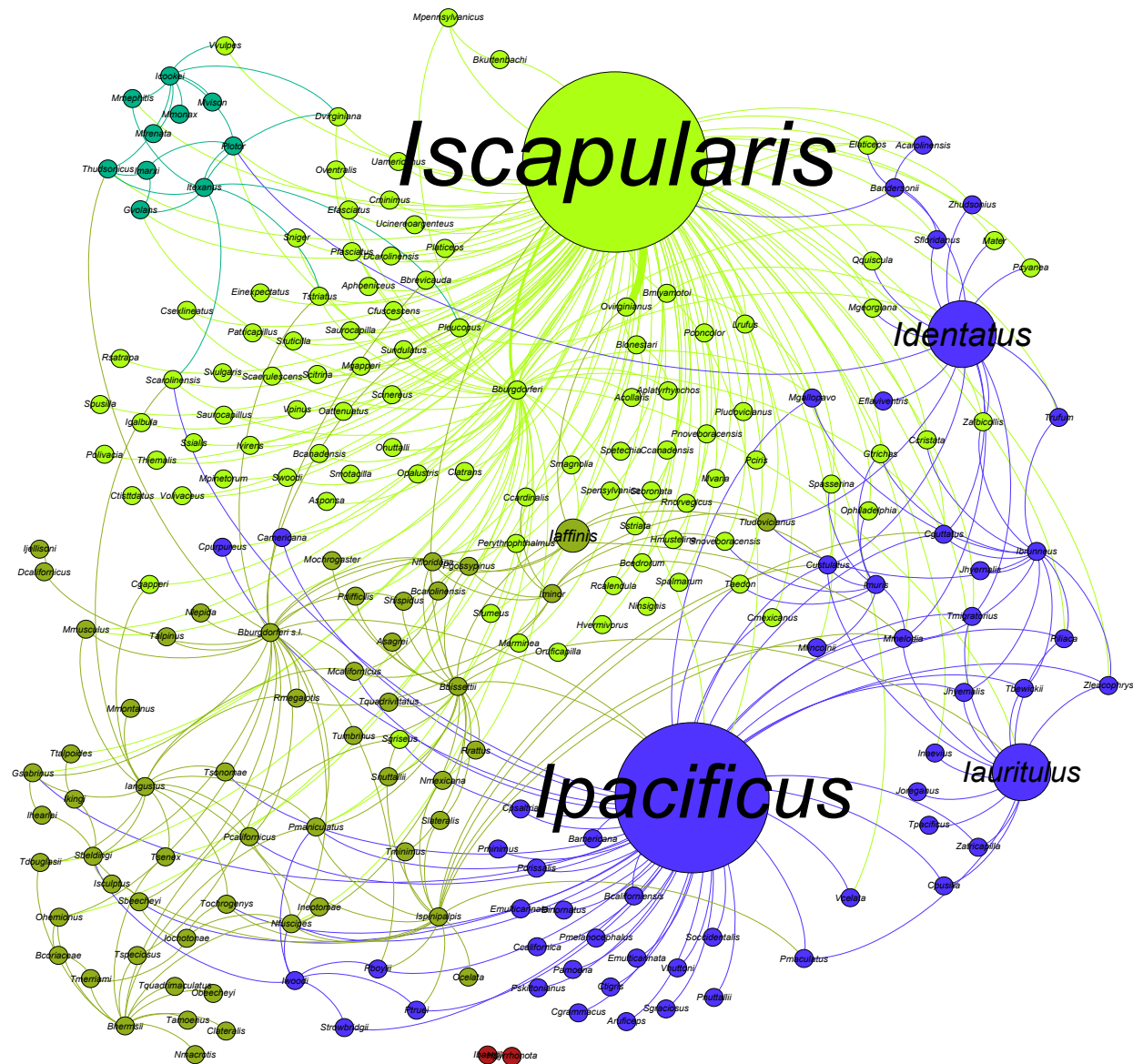


Figura 2: La red de garrapatas, vertebrados y patógenos que conforman la transmisión del complejo *Borrelia burgdorferi* en Estados Unidos. Los 5 “clusters” encontrados por el algoritmo de modularidad se han representado con el esquema ForceAtlas2. Cada círculo es una especie en la red, bien sea de garrapata, vertebrado o patógeno. El tamaño de cada círculo es proporcional al valor del índice B, y el tamaño de la etiqueta del nombre de la especie es proporcional a su valor de PR. Cada línea indica una interacción entre dos especies, su color es el mismo que el del agrupamiento al que pertenece y su anchura es proporcional al índice S.

Tabla 2. Datos pormenorizados de los índices tipológicos de la red de *Borrelia burgdorferi* en EEUU. Se incluyen los valores de B, PR y S. Se ha distinguido entre *B. burgdorferi* y *B. burgdorferi* s.l., en la que la última no había sido clasificada hasta la geno-especie por métodos de amplificación de ADN, pero que eran necesarios para completar la red epidemiológica.

Especie	Betweenness (B)	PageRank (PR)	Strenght (S)
<i>Bamericana</i>	0	0.00402	2
<i>Bandersonii</i>	0	0.00402	5
<i>Bbissettii</i>	0	0.00402	39
<i>Bbrevicauda</i>	0	0.00407	7
<i>Bburgdorferi</i>	0	0.00402	184
<i>Bburgdorferi s.l.</i>	0	0.00402	43
<i>Bcaliforniensis</i>	0	0.00402	1
<i>Bcanadensis</i>	0	0.00410	1
<i>Bcarolinensis</i>	0	0.00402	9
<i>Bcedrorum</i>	0	0.00407	1
<i>Bcoriaceae</i>	0	0.00402	2
<i>Bhermsii</i>	0	0.00402	15
<i>Binornatus</i>	0	0.00423	2
<i>Bkurtenbachi</i>	0	0.00402	3
<i>Blonestari</i>	0	0.00402	9
<i>Bmiyamotoi</i>	0	0.00402	23
<i>Iaffinis</i>	1.783	0.00428	19
<i>Iangustus</i>	0	0.00402	21
<i>Iauritulus</i>	12.616	0.00428	20
<i>Ibaergi</i>	0	0.00402	1
<i>Ibrunneus</i>	0	0.00402	18
<i>Icookei</i>	0	0.00402	12
<i>Identatus</i>	20.366	0.00547	26
<i>Igalbula</i>	0	0.00407	1
<i>Ihearlei</i>	0	0.00402	2
<i>Ijellisoni</i>	0	0.00402	2
<i>Ikingi</i>	0	0.00402	2
<i>Imarxi</i>	0	0.00402	3
<i>Iminor</i>	0	0.00402	11
<i>Imuris</i>	0	0.00402	11
<i>Ineotomae</i>	0	0.00402	1
<i>Iochotona</i>	0	0.00402	5
<i>Ipacificus</i>	231.45	0.01194	106

<i>Iscapularis</i>	584.783	0.00750	648
<i>Isculptus</i>	0	0.00402	4
<i>Ispinipalpis</i>	0	0.00402	22
<i>Itexanus</i>	0	0.00402	11
<i>Iwoodi</i>	0	0.00402	7

La red tiene una estructura anidada. En los sistemas biológicos, el anidamiento se corresponde con la presencia de sub-redes, que se encuentran incluidas dentro de la red general. Es decir, se trata de pequeñas redes de especialistas que se engloban dentro de la red de generalistas. Este es el caso para la red de *Borrelia*, pues los valores de anidamiento de cada agrupamiento son ligeramente menores a 0.84 (en un rango entre 0 y 1). El grupo principal de especies está dominado por *I. scapularis*, especies a la que están conectadas 112 especies de reservorios. Prácticamente todas las especies de reservorios detectados en la red se encuentran, en menor o mayor grado, conectados con la especie principal de vector en la red. Sin embargo, el algoritmo de agrupamiento detecta que el grupo de *I. scapularis* no tiene otras especies de garrapatas. Es decir, las restantes especies de garrapatas, sus reservorios, y los patógenos, forman sub-redes dentro de este grupo principal (marcado en color verde-amarillento en la figura 1). La única garrapata del género *Ixodes* en EEUU que no está unida a la red de transmisión de *Borrelia* es *I. baergi* (grupo 4) que se ha hallado asociada exclusivamente a una sola especie de hospedador, que tampoco participa en el mantenimiento de los focos del patógeno. El otro grupo de importancia en la red de *Borrelia* es el formado por *I. pacificus*, que se encuentra asociado a las especies *I. auritulus*, *I. brunneus*, *I. dentatus* e *I. woodi*. La tabla 3 resume los datos relativos a las especies de garrapatas, sus agrupamientos ("clusters"), el número de especies de hospedadores a las que se asocian y las especies de *Borrelia* que se han detectado en cada uno de ellos. En esa tabla también se agrupan los registros según los órdenes de reservorios Rodentia y Passeriformes, para mostrar la contribución relativa de ambos grupos de vertebrados en el mantenimiento de los de infección por *Borrelia* spp.

Tabla 3. Datos generales sobre las especies de *Borrelia* y de *Ixodes* que constituyen la red de transmisión de la borreliosis de Lyme en Estados Unidos. Se incluyen los datos relativos al grupo en el que se encuentran encuadradas, el número de registros totales que se han empleado de cada una de las especies, junto con los registros encontrados sobre reservorios del orden Passeriformes y del orden Rodentia, como medida de la contribución de estos hospedadores a la circulación del patógeno.

Especie	Nº de registros	Grupo ("cluster")	Nº de registros en Passeriformes	Nº de registros en Rodentia
<i>Bamericana</i>	2	5	2	
<i>Bandersonii</i>	5	5	2	
<i>Bbissettii</i>	39	5	10	26
<i>Bburgdorferi</i>	184	1	101	62
<i>Bburgdorferi</i>	43	2	7	34
<i>Bcaliforniensis</i>	1	5	1	
<i>Bcarolinensis</i>	9	2		9
<i>Bcoriaceae</i>	2	2		1
<i>Bhermsii</i>	15	2		14
<i>Bkurtenbachii</i>	3	1	2	1
<i>Blonestari</i>	9	1		
<i>Bmiyamotoi</i>	23	1	21	1
<i>Iaffinis</i>	5	2	2	2
<i>Iangustus</i>	21	2		21
<i>Iauritulus</i>	18	5	18	
<i>Ibaergi</i>	1	4	1	
<i>Ibrunneus</i>	18	5	17	
<i>Icookei</i>	12	3		3
<i>Identatus</i>	23	5	17	1
<i>Ihearlei</i>	2	2		2
<i>Ijellisoni</i>	2	2		2
<i>Ikingi</i>	2	2		2
<i>Imarxi</i>	3	3		2
<i>Iminor</i>	11	2	6	5
<i>Imuris</i>	11	5	11	
<i>Ineotomae</i>	1	2		1
<i>Iochotonae</i>	5	2		5
<i>Ipacificus</i>	78	5	40	22
<i>Iscapularis</i>	551	1	151	80
<i>Isculptus</i>	4	2		4
<i>Ispinipalpis</i>	22	2	6	16

<i>Itexanus</i>	11	3	5
<i>Iwoodi</i>	7	5	6

Es necesario mencionar la alta contribución que tanto los roedores como las aves Passeriformes tienen en esta red. La mayor parte de los registros totales se han encontrado sobre estos dos grupos de hospedadores. Sin embargo, es necesario ajustar estos datos (debido al posible desvío de capturas hacia los hospedadores más comunes, o que son más importantes desde el punto de vista sanitario) y observar sus contribuciones de una forma agregada y en comparación con otros vertebrados que intervienen en el ciclo del patógeno (Tabla 4). El valor de PR es máximo para los Rodentia y Passeriformes, lo que indica que estos reservorios son los que aportan una mayor contribución a la circulación del grupo de *B. burgdorferi* y todas sus geno-especies en la red epidemiológica. Es necesario destacar la contribución, en tercer lugar, de los reptiles (Squamata) que son los hospedadores habituales de todas las garrapatas incluidas dentro del agrupamiento 5, fundamentalmente de *I. pacificus*.

Tabla 4. Valores de PR para los diferentes órdenes de reservorios en la red de circulación del complejo *Borrelia burgdorferi* en Estados Unidos. En negrita, se destaca la contribución de las aves Passeriformes y de los roedores.

Orden Taxonómico de Reservorios	Contribución a la circulación de <i>Borrelia</i> (PR)
Anseriformes	0.0146
Artiodactyla	0.0122
Carnivora	0.0492
Didelphimorphia	0.0050
Galliformes	0.0095
Insectivora	0.0130
Lagomorpha	0.0093
Passeriformes	0.3479
Piciformes	0.0042
Rodentia	0.2837
Squamata	0.0764

El objetivo central de la ecología es entender las interacciones tróficas entre los miembros de una comunidad (Lawton y Warren, 1988). Este estudio se ha centrado en un patógeno de importancia para la salud pública, y que hemos enfocado sobre el territorio de EEUU por la mayor cantidad de citas y registros de calidad. Este trabajo ha demostrado que las interacciones entre garrapatas, patógenos y reservorios se pueden deducir a partir de un procesamiento masivo de datos utilizando métodos que analizan la topología de una red, similar a las redes tróficas, en la que se analizan términos de “quién parasita a quién” y “quién es transmitido (vehiculado) por quién”. En otras palabras, las estrategias estadísticas utilizadas para definir otras redes, como una red social (Gómez et al., 2013) son capaces de deducir la estructura, interacciones e importancia de cada actor en la circulación de un patógeno. Estos datos suponen una forma diferente de analizar la circulación en la naturaleza de un agente patógeno transmitido por vectores, y que complementan los estudios de campo, necesarios como base para emprender cualquier tipo de meta-análisis. Hemos empleado varios índices para dilucidar las asociaciones eco-epidemiológicas de la borreliosis de Lyme en EEUU, algo que no había sido abordado con esta metodología hasta el momento. Es posible que la recopilación parcial de datos haga que la red sea incompleta para el territorio analizado, posiblemente por la falta de referencias que no aparecen indexadas (como comunicaciones a congresos o publicaciones en revistas locales) pero su estructura es fidedigna, ya que los índices han sido calculados mediante métodos validados (Gómez et al., 2013) y los datos han sido adecuadamente ponderados para evitar la pérdida de datos acerca de las relaciones bióticas examinadas.

La red resultante está obviamente circunscrita a una zona geográfica dada, pero proporciona una serie de datos que permiten entender la elevada persistencia de la enfermedad en EEUU. Mientras que dos especies de garrapatas (*I. scapularis* e *I. pacificus*) mantienen el agente infeccioso mediante el parasitismo a un amplio abanico de hospedadores, existen otras especies que contribuyen (aunque escasamente) a la diseminación del agente infeccioso actuando como puentes entre los diversos “clusters” de reservorios. En otras palabras, aunque las acciones naturales (clima, falta de alimento) pudieran erradicar o disminuir la abundancia de alguno de los vertebrados reservorios, otras especies podrían tomar su lugar dentro de la red y seguir permitiendo la circulación del patógeno. El carácter generalista de algunas de las especies de garrapatas encontradas en el estudio de la literatura, sugiere que pueden utilizar una amplia gama de hospedadores.

La amplia variedad de vertebrados (aves, mamíferos y reptiles) que están implicados en la alimentación de los vectores (Keesing et al., 2010) es un reflejo de la alta estabilidad de este sistema agente-vector-reservorio. Los valores de centralidad obtenidos mediante los índices B y PR indican

que unas pocas especies de reservorios son las más comunes en el mantenimiento de la infección, como ciertos roedores, aves y el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*). En el último caso, se trata de un hospedador que tan solo sirve de alimento a los adultos de las garrapatas del género *Ixodes*, y que no es capaz de mantener la infección (Keesing et al., 2010). Estos resultados son directamente comparables con los datos obtenidos en numerosos muestreos de campo, e indican la solidez del método que se ha empleado en este estudio, a la vez que permiten concluir que las actuaciones de control y/o de erradicación de alguno de estos reservorios no eliminarían la infección, debido a la existencia de una amplia gama de otros vertebrados que se pueden comportar como tales.

Es necesario hablar aquí del “efecto dilución”, un proceso que parece afectar de forma drástica a los focos naturales de borreliosis de Lyme, y cuya “estructura ecológica” se aprecia superficialmente en los datos de la red estudiada. El efecto dilución es una consecuencia de la falta de biodiversidad en un paraje determinado (Schmidt y Ostfeld, 2001; LoGiudice et al., 2003; Johnson y Thielges, 2010). Si existe una alta biodiversidad, en otras palabras si existe un alto número de especies de hospedadores para la garrapata, solamente unas pocas de esas especies pueden comportarse como reservorios. Es decir, existen unas probabilidades relativamente altas de que la garrapata se alimente sobre hospedadores que no son reservorios, o incluso sobre reservorios no infectados (LoGiudice et al., 2003). Si la biodiversidad disminuye, las probabilidades de que la garrapata se alimente sobre un reservorio son mayores, por lo que la prevalencia de la infección será mayor. Es decir, el foco de infección será más activo en aquellas zonas en las que la biodiversidad es baja. Aunque este estudio no pretende abordar esas complejas interacciones, la estructura de la red muestra en parte este efecto. La adecuada combinación de vertebrados, reservorios o no, que constituyen la fuente de alimentación de las garrapatas en la naturaleza, debe estar adecuadamente. Si aquellos hospedadores que tienen un alto valor de PR son los únicos que permanecen en un foco de infección, la mayor parte de las garrapatas se alimentarán sobre ellos y la prevalencia de la infección en los vectores aumentará. Es decir, los datos aportados por la red epidemiológica coinciden en señalar una serie de reservorios con alta capacidad de mantenimiento de la infección. En ausencia de las restantes especies, estos reservorios “super-dispersadores” son los responsables del mantenimiento del foco.

La cohesión de la red se debe pues al alto número de reservorios que están altamente interconectados. La existencia de diferentes agrupamientos (o “clusters” en la terminología sajona) indica que algunas especies de garrapatas y sus hospedadores forman grupos ecológicos bien separados en la estructura completa de la red, pero que permiten la circulación del patógeno de forma restringida en una zona concreta. Estos “clusters” proporcionan coherencia e interconectividad a la red, de

forma que la ausencia de unos de los actores no desmorona la red completa. El alto número de “nodos puente” que cohesionan los “clusters” es una prueba de la alta solidez epidemiológica que mantiene la transmisión de *Borrelia* (Jordano et al, 1994).

7. Conclusiones

La borreliosis de Lyme en el territorio de los EEUU se transmite mediante focos de alta estabilidad debido a una amplia variedad de vectores y reservorios implicados en el mantenimiento del patógeno bajo condiciones naturales. La consecuencia epidemiológica es que estas asociaciones son muy robustas a la perturbación (Pastor-Satorras y Vespignani, 2001). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el complejo *B.burgdorferi* está asociado a un amplio grupo de reservorios, y que, bajo un concepto epidemiológico, la bacteria es capaz de alcanzar grupos de reservorios que están filogenéticamente poco emparentados (aves, reptiles, mamíferos) provocando así fenómenos de especiación (Kurtenbach et al, 1994; Margos et al, 2011). El solapamiento de reservorios y vectores detectado en este estudio, concluye que la red se mantiene mediante el reemplazo no selectivo de los actores que vehiculan y mantienen el patógeno, y que independientemente del territorio geográfico, la permanencia del mismo está asegurada. Esta es una cuestión básica en la epidemiología de cualquier enfermedad, la dilucidación de los ricos patrones de reservorios que contribuyen al mantenimiento y diseminación de un agente infeccioso. La aproximación al problema usando la metodología de redes abre una nueva forma para entender estas relaciones epidemiológicas. Estos métodos pueden emplearse en futuros desarrollos encaminados a dilucidar los factores que condicionan la persistencia de agentes patógenos tanto en escalas temporales como geográficas.

Conclusions

Lyme borreliosis in the territory of the USA is transmitted through pockets of high stability due to wide variety of vectors and reservoirs involved in maintaining the pathogen under natural conditions. The epidemiological consequence is that these associations are very resilient to disturbance (Pastor-Satorras and Vespignani, 2001). These results support the hypothesis that the *B. burgdorferi* complex is associated with a large group of reservoirs, and under an epidemiological concept, the bacteria is able of reaching groups of reservoirs that are phylogenetically only slightly related (birds, reptiles, mammals) thereby causing phenomena of speciation (Kurtenbach et al, 1994; Margos et al, 2011). The overlap of reservoirs and vectors detected in this study concluded that the network is maintained by the non-selective replacement of the actors that transmit and maintain the pathogen, and regardless of geographical territory, permanence of foci is guaranteed. This is a basic issue in the epidemiology of any disease, the elucidation of the rich reservoirs patterns that contribute to the maintenance and spread of an infectious agent. The approach to the problem using the methodology of networks opens a new way to understand these epidemiological relationships. These methods can be used in future developments aimed to elucidate the factors that influence the persistence of pathogens in both temporal and geographical scales.

7. Valoración personal.

Esta última asignatura de la titulación, que toma la forma de trabajo o revisión, ha supuesto un reto y una fuente de aprendizaje y evolución como estudiante universitaria y como futura profesional de la veterinaria.

En primer lugar, la propuesta del director me ha brindado la oportunidad de aprender acerca de una forma diferente de plantear aspectos epidemiológicos, alejada de la clásica basada en la pura estadística. Si bien el tema me era conocido por los estudios de Grado, durante la realización del proyecto he tenido numerosas ocasiones de buscar información, leer y comentar con el director diversos aspectos relacionados con la Borreliosis de Lyme. En relación a esta búsqueda, cabe destacar la mejora en mis habilidades para la gestión de la información tras la realización del trabajo. Así pues, con la orientación del director he sido capaz de aprender a discernir y filtrar los artículos científicos que pudieran ser de interés de otros de menor utilidad. También he conocido nuevos motores de búsqueda apropiados al nivel científico y académico propio de un trabajo de esta envergadura y que me han servido de gran ayuda en este proyecto, pudiendo ser de mucha utilidad a su vez en futuras consultas.

El proceso de obtención de datos que he llevado a cabo implicaba una obvia complejidad, tanto por el número elevado de artículos que se habían recopilado como por la necesidad de filtrar la información. Finalmente, a pesar de la cantidad de artículos y gracias también a la ayuda del director en algunos casos concretos, he sido capaz de desarrollar una capacidad de extracción de datos relevantes para el trabajo con una lectura rápida de los artículos.

Una vez obtenidos los datos y gestionados adecuadamente, el procesado ha resultado ser una metodología de interés para otros problemas epidemiológicos. Si bien ha sido el director quien fundamentalmente ha elaborado las redes, su explicación y la comprensión por mi parte de la interpretación de los resultados ha supuesto un gran aporte para mi formación. De este modo, los conocimientos reducidos que poseía acerca de la epidemiología de la enfermedad se han visto ampliamente completados, desde un punto de vista novedoso e inexplorado por mi parte. Así pues, pienso que el abordaje de una situación ecológica aplicando metodologías hasta ahora empleadas en otras áreas otorga a este trabajo un punto de originalidad y novedad.

8. Referencias.

- Anderson, T.V. & Sukhdeo, M.V.K. Host centrality in food webs networks determines parasite diversity. *PLoS One* **6**, e26798 (2011).
- Bersier, L.F., Banasek-Richter, C. & Cattin, M.F. Quantitative descriptors of food-web matrices. *Ecology* **83**, 2394-2407 (2002).
- Blondel, V.D., Guillaume, J.-L., Lambiotte, R. & Lefebvre, E. Fast unfolding of communities in large networks. *J. Stat. Mechanics: Theory and Experiment*, Online at stacks.iop.org/JSTAT/2008/P10008 (2008).
- Cattin, M.-F., Bersier, L.-F., Banasek-Richter, C., Baltensperger, R., Gabriel, J.-P. Phylogenetic constraints and adaptation explain food-web structure. *Nature* **427**, 835-839 (2004).
- Clauset, A., Moore, C. & Newman, M.E.J. Hierarchical structure and the prediction of missing links in networks. *Nature* **453**, 98-101 (2008).
- Csardi, G., & Nepusz, T. The igraph software package for complex network research, *Int. J. Complex Systems* **1695** (2006) <http://igraph.org>.
- Estrada-Peña, A., Ostfeld, R.S., Peterson, A.T., Poulin, R., & de la Fuente, J. Effects of environmental change on zoonotic disease risk: an ecological primer. *Trends Parasitol.* **30**, 205-214 (2014).
- Estrada-Peña, A., de la Fuente, J., Ostfeld, R. S., & Cabezas-Cruz, A. Interactions between tick and transmitted pathogens evolved to minimise competition through nested and coherent networks. *Nature Scientific reports*, **5**. (2015).
- Fortuna, M.A. *et al.* Nestedness versus modularity in ecological networks: two sides of the same coin? *J. Animal Ecol.* **79**, 811-817 (2010).
- Gómez, J.M., Nunn, C.L., Verdú, M. Centrality in primate-parasite networks reveals the potential for the transmission of emerging infectious diseases to humans. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **110**, 7738-7741 (2013).
- Guimaraes, P.R. & Guimaraes, P. Improving the analyses of nestedness for large sets of matrices. *Environ. Model. Softw.* **21**, 1512–1513 (2006).
- Hernandez, A.D. & Sukhdeo, M.V.K. Parasites alter the topology of a stream food web across seasons. *Oecologia* **156**, 613–624 (2008).

- Jacomy, M., Heymann, S., Venturini, T. & Bastian, M. ForceAtlas2, a continuous graph layout algorithm for handy network visualization. Gephi's documentation manual, available at http://wiki.gephi.org/index.php/Main_Page.
- Johnson, P.T.J., Thielges, D.W. Diversity, decoys and the dilution effect: how ecological communities affect disease risk. *J. Exp. Biol.*, **213**, 961-970 (2010).
- Jordano, P., Bascompte, J., & Olesen, J.M. The ecological consequences of complex topology and nested structure in pollination webs. In: Waser NM, Ollerton J, eds. Specialization and generalization in plant-pollinator interactions. Chicago: University of Chicago Press. pp 173–199 (2006).
- Keesing, F., Belden, L. K., Daszak, P., Dobson, A., Harvell, C. D., Holt, R. D., & Ostfeld, R. S. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature* **468**, 647-652 (2010).
- Kourtellis, N., Alahakoon, T., Simha, R., Iamnitchi, A., & Tripathi, R. Identifying high betweenness centrality nodes in large social networks. *Social Network Anal. Mining* **3**, 899-914 (2013).
- Krasnov, B.R., Stanko, M., & Morand, S. Host community structure and infestation by ixodid ticks: repeatability, dilution effect and ecological specialization. *Oecologia* **154**, 185-194 (2007).
- Kurtenbach, K., Dizij, A., Seitz, H. M., Margos, G., Moter, S. E., Kramer, M. D., & Simon, M. M. Differential immune responses to *Borrelia burgdorferi* in European wild rodent species influence spirochete transmission to *Ixodes ricinus* L.(Acari: Ixodidae). *Infect. Imm.* **62**, 5344-5352 (1994).
- Lafferty, K.D., *et al.* Parasites in food webs: the ultimate missing links. *Ecology letters* **11**, 533-546 (2008).
- Lawton, J.H., & Warren, P.H. Static and dynamic explanations for patterns in food webs. *Trends Ecol. Evol.* **3**, 242-245 (1988).
- LoGiudice, K., Ostfeld, R. S., Schmidt, K. A., Keesing, F. The ecology of infectious disease: effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk. *Proc. Nat. Academy of Sciences*, **100**, 567-571. (2003).
- Margos, G., Vollmer, S.A., Ogden, N.H., Fish, D. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infection, Genetics and Evol.* **11**, 1545-1563 (2011).
- Ostfeld, R.S., & Keesing, F. Biodiversity series: the function of biodiversity in the ecology of vector-borne zoonotic diseases. *Can. J. Zool.* **78**, 2061-2078 (2000).

- Ostfeld, R.S., Glass, G.E., & Keesing, F. Spatial epidemiology: an emerging (or re-emerging) discipline. *Trends Ecol. Evol.* **20**, 328-335 (2005).
- Parker, G.A., Chubb, J.C., Ball, M.A. & Roberts, G.N. Evolution of complex life cycles in helminth parasites. *Nature* **425**, 480-484 (2003).
- Pastor-Satorras, R., & Vespignani, A. Epidemic spreading in scale-free networks. *Phys. Rev. Lett.* **86**, 3200-3203 (2001).
- Patz, J.A., Campbell-Lendrum, D., Holloway, T., & Foley, J.A. Impact of regional climate change on human health. *Nature* **438**, 310-317 (2005).
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/> (2014).
- Radolf, J.D., Caimano, M.J., Stevenson, B., Hu, L.T. Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nature Rev. Microbiology* **10**, 87-99 (2012).
- Randolph, S.E. & Rogers, D.J. The arrival, establishment and spread of exotic diseases: patterns and predictions. *Nature Rev.* **8**, 361-371 (2010).
- Rudolf, V.H.W., & Lafferty, K.D. Stage structure alters how complexity affects stability of ecological networks. *Ecology letters* **14**, 75-79 (2011).
- Schmidt, K.A., Ostfeld, R. S. Biodiversity and the dilution effect in disease ecology. *Ecology*, **82**, 609-619 (2001).
- Shaw, M.T., Keesing, F., McGrail, R., & Ostfeld, R.S. Factors influencing the distribution of larval blacklegged ticks on rodent hosts. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **68**, 447-452 (2003).
- Wells, K., O'Hara, R.B., Pfeiffer, M., Lakim, M.B., Petney, T.N., & Durden, L.A. Inferring host specificity and network formation through agent-based models: tick-mammal interactions in Borneo. *Oecologia* **172**, 307-316 (2013).