



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

Relaciones entre el clima, la vegetación y la
prevalencia de *Borrelia burgdorferi s.l.* en
garrapatas en Europa: apuntes para la aproximación
a un modelo de riesgo

Tamara Latapia Buisán

Director:

Agustín Estrada Peña

Facultad de Veterinaria
2012

ÍNDICE

I. Introducción.....	4
II. Revisión Bibliográfica	7
II. 1.- Historia de la enfermedad de Lyme.....	8
II. 2.- Agente causal de la enfermedad de Lyme.....	11
II.2.1.- Especies y genospecies	
II.2.2.- Epidemiología	
II.2.3.- Hospedadores	
II. 3.- Vector.....	14
II.3.1.- Ciclo vital	
II. 4.- Diagnóstico de <i>B. burgdorferi</i> s.l en <i>Ixodes ricinus</i>	18
II.4.1.- Aislamiento de <i>Borrelia</i> en <i>Ixodes ricinus</i>	
II.4.2.- Identificación de genospecies de <i>Borrelia</i> mediante PCR y RFLP	
II. 5.- Diagnóstico de <i>B. burgdorferi</i> en humanos.....	19
II.5.1- Diagnóstico directo	
II.5.1.1.- Cultivo	
II.5.1.2.- Visualización	
II.5.2.- Diagnóstico indirecto	
II.5.2.1.- Métodos de diagnóstico	
II.5.3.- Técnicas de amplificación genética	
II. 6.- Situación actual de la Borreliosis de Lyme.....	21
III.- Objetivos.....	24
IV.- Material y métodos.....	26
IV. 1.- Colección de datos.....	27
IV. 1.2.- Método de detección de <i>B. burgdorferi</i>	

IV. 2.- Establecimiento de la relación entre factores abióticos y prevalencia de infección en garrapatas.....	30
IV. 2.1.- Clasificación de los niveles de prevalencia	
IV. 2.2.- Obtención de los factores abióticos	
IV. 2.3.- Análisis estadístico	
IV. 2.3.1.- Análisis de riesgo	
V.- Resultados y discusión.....	35
V.1.- Distribución de los valores de cada variable abiótica en función de los niveles de prevalencia de <i>Borrelia spp.</i> en garrapatas.....	36
V.2.- Asociación entre la distribución de los valores de las variables abióticas estudiadas y la prevalencia de <i>Borrelia spp.</i> en garrapatas	44
V.3.- Diseño del análisis de riesgo cualitativo de infección por <i>Borrelia spp.</i> en garrapatas en función de los valores de las variables abióticas estudiadas	46
VI.- Resumen.....	52
VII.- Conclusiones.....	54
VIII.- Referencias bibliográficas	56

I.- INTRODUCCIÓN

I.- INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Lyme (LB), también conocida como borreliosis de Lyme (BL), es una zoonosis infecciosa causada por la bacteria *Borrelia burgdorferi* y transmitida por garrapatas del género *Ixodes*. La bacteria se mantiene en un ciclo de transmisión horizontal entre su vector, las garrapatas del complejo *Ixodes ricinus* y los vertebrados (9).

La enfermedad de Lyme se distribuye en una amplia área geográfica en regiones templadas del hemisferio norte del mundo (3).

El estudio de la distribución y características de esta enfermedad ha avanzado rápidamente en EEUU, ya que en el Neártico solamente existe *Borrelia burgdorferi* como agente causal. Ello ha permitido hacer una definición de caso de vigilancia de BL para la información nacional de la enfermedad de Lyme (3).

No ocurre lo mismo en Europa donde existen al menos 6 especies patógenas de *Borrelia*. Por ello, el espectro de la enfermedad es muy amplio, no hay una definición clara de BL y por tanto no puede haber una monitorización permanente de la enfermedad (11). Por ello no existen estadísticas validas acerca de la prevalencia en la especie humana en el continente Europeo. Por otro lado, el cálculo del riesgo para la especie humana a partir de las propias series de casos es un concepto erróneo. Además la prevalencia de la infección en la propia garrapata, diversos detalles relativos al reservorio, el patógeno, el hábitat y el clima, intervienen los factores sociológicos que condicionan el contacto de los grupos de riesgo con las garrapatas, infectadas o no.

En este estudio, hemos pretendido asociar las tasas de prevalencia del agente patógeno en las garrapatas en todo el entorno geográfico del Paleártico occidental, con una serie de factores ambientales y climáticos, que permitieran establecer una

definición de riesgo objetiva. Este estudio se basa en imágenes de satélite y en un meta-análisis de la información publicada, para construir tal sistema de previsión de riesgo.

II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1.- HISTORIA DE LA ENFERMEDAD

A partir de 1883, comenzaron a aparecer en Europa registros de enfermedad de Lyme. En Breslau, Alemania, un médico llamado Alfred Buchwald descubrió una condición conocida hoy como la acrodermatitis atrófica crónica (ACA), que se describe como la decoloración o la degeneración de la piel que ocurren comúnmente en las manos y los pies (34).

En la reunión de 1909 de la Sociedad Sueca de Dermatología, Arvid Afzelius presentó su investigación sobre un fenómeno descrito como expansión en forma de anillo de las lesiones de la piel y el patrón de erupción que se había observado desde hace años; 12 años más tarde, publicó el manuscrito de su obra, especulando que esta condición provenía de la picadura de una garrapata del género *Ixodes* (34).

Durante la primera parte del siglo XX, se produjeron más asociaciones sobre los signos y síntomas de la enfermedad de Lyme. Los casos médicos que se utilizaron en la investigación incluyen la relación entre el eritema migrans (EM), erupción cutánea y problemas neurológicos en el año 1922, la aparición de síntomas psiquiátricos en pacientes con erupción de EM en 1930, la aparición de la EM y la ACA en los pacientes con nódulo benigno o rubor en 1934 y la participación de las enfermedades del corazón en pacientes con síntomas de EM y artritis (34).

En 1976 la enfermedad de Lyme fue descrita como una entidad separada debido a la agrupación geográfica de niños afectados, quienes presentaban artritis reumatoide, vivían en zonas rurales y el comienzo de los

síntomas era en verano. La presentación de los casos dentro de las mismas familias en diferentes años sugirió que el proceso era transmitido por un artrópodo. Además, algunos de los pacientes iniciales notaron una lesión expansiva roja en la piel, pensando que era por la picadura de un insecto, antes del comienzo de la artritis. La lesión era mas comparable con el eritema migrans (EM), el cual fue descrito por primera vez en Europa a principios del siglo XX y en EEUU a mitad del siglo XX. En Europa, las lesiones de piel habían sido asociadas con la picadura de *Ixodes ricinus* y con posteriores anomalías neurológicas pero no con artritis (34).

Durante el verano de 1976, veinticuatro pacientes fueron identificados con EM y días más tarde el 75% de ellos desarrollaron artritis, confirmando así el enlace entre las lesiones de piel y la artritis. Por otra parte algunos de los pacientes desarrollaron cuadros neurológicos y anomalías cardíacas, las cuales demostraban que la enfermedad de Lyme era un complejo multisistémico (34).

En el verano de 1977, más estudios epidemiológicos de pacientes de Lyme (Connecticut), con EM, implicaron a garrapatas *Ixodes scapularis*, un miembro del complejo *I. ricinus*, como vector de la enfermedad de Lyme (34).

En este mismo año, un médico llamado Allen Steere y su equipo lograron describir y proporcionar una explicación de los fenómenos, lo cual fue inicialmente mal diagnosticado como la artritis reumatoide, llamando a la condición "artritis de Lyme" (34).

En 1979, se habían identificado 512 casos de enfermedad de Lyme en los EEUU a lo largo de la costa noroeste y al norte de California. Las localizaciones a lo largo de la costa noroeste estaban correlacionadas con la distribución de *I. scapularis* y las del norte de California con la de *I. pacificus*.

Con ello se evidenciaba, una fuerte implicación de las garrapatas del complejo *I. ricinus* como vectores de la enfermedad (34).

En 1980, un entomólogo llamado Willy Burgdorfer y su equipo del laboratorio del CDC descubrieron una bacteria, una espiroqueta que posteriormente se llamaría *Borrelia burgdorferi*, en el intestino medio de una ninfa de *I. scapularis*. El descubrimiento de una forma embrionaria de parásito en el fluido del cuerpo de las garrapatas, llevó a Burgdorfer al descubrimiento del agente causal de la enfermedad de Lyme (34).

La espiroqueta fue consecuentemente aislada de las lesiones de EM, de sangre y de líquido cerebro espinal de pacientes con enfermedad de Lyme en los EEUU y de pacientes con los mismos síndromes en Europa (34).

Los años siguientes se describe como la consolidación y ampliación de conocimientos sobre la enfermedad de Lyme. Los investigadores se concentraron en aprender acerca de la infección de la bacteria (34).

II.2.- AGENTE CAUSAL DE LA ENFERMEDAD

La enfermedad de Lyme o Borreliosis está causada por espiroquetas gram negativas del género *Borrelia*, que tiene al menos 37 especies conocidas de las cuales 12 están relacionadas con la enfermedad de Lyme. A este grupo de especies se las engloba dentro del complejo de *Borrelia burgdorferi sensu lato* (25, 31)

II.2.1.- Especies y genoespecies

Hasta hace poco, se creía que existían sólo tres especies causantes de la enfermedad de Lyme: *B. burgdorferi sensu stricto* (la especie predominante en América del Norte y también en Europa), *B. afzelii* y *B. garinii* (ambas predominantes en Eurasia). Ahora se conocen nuevas especies emergentes como *B. valaisiana* (se ha aislado en toda Europa así como en Asia), *B. lusitaniae* (Europa, sobre todo Portugal, norte de África y Asia); *B. bissetti* (EEUU y Europa) y *B. spielmanii* (Europa) (25,31).

Recientemente, el serotipo 4 OspA de *B. garinii* se ha asociado con una nueva especie, *Borrelia bavariensis* (27).

II.2.2.- Epidemiología

B. burgdorferi es transmitida de los animales al ser humano por garrapatas pertenecientes al complejo *Ixodes ricinus*. La transmisión ocurre durante la alimentación, bien sea por salivación, regurgitación o ambos procesos (34).

La enfermedad de Lyme es endémica en las zonas templadas de la mayor parte del Hemisferio Norte. Sin embargo, se han descrito casos esporádicos de la enfermedad en otras partes del Mundo. Muchos de los casos

pueden ser un error de diagnóstico, como por ejemplo casos indicados en América del Sur, en donde se sospecha que no existe el agente patógeno (25).

La borreliosis de Lyme se ha convertido en la enfermedad transmitida por artrópodos más frecuente en Estados Unidos y Europa (25). La LB se produce en toda Europa, con una distribución paralela a la del vector *I. ricinus*. Esta especie de garrapatas pueden ser infectadas con *Borrelia* a lo largo de su amplia distribución, desde el norte de Turquía y las montañas del Atlas de Túnez al centro de Suecia (9, 15, 17).

En Europa, el mayor número de casos por *B. burgdorferi* s.l. se ha citado en países donde la incidencia por las garrapatas vectores es alta, como Suecia, Noruega, los Países Bajos, Alemania, Francia, Italia, Eslovenia y Polonia, pero las espiroquetas se han aislado en casi todos los países del continente (25, 31).

La infección se mantiene en la naturaleza en reservorios animales, habiéndose confirmado en Europa el papel de reservorio competente de varios pequeños mamíferos (roedores e insectívoros) y algunas aves. Las garrapatas, por lo general las larvas y ninfas, adquieren la infección cuando se alimentan en uno de estos hospedadores infectados y la infección se transmite de forma transestadial a la siguiente fase. Como la transmisión transovárica no existe, son las ninfas y los adultos los que transmiten la infección al alimentarse en un hospedador sano (34).

El periodo de riesgo en humanos por la picadura de las garrapatas se centra sobre todo entre Mayo y Julio, siendo particularmente importante en las formas de ninfa, ya que estas no son visibles a simple vista con lo que es difícil tratar de eliminarlas. Los adultos se ven bien a simple vista y suelen eliminarse antes de que lleguen a picar (31).

Hasta el momento no se ha observado transmisión al hombre a través del aire, ni por contacto directo con animales infectados, ni por contacto con sangre, secreciones y excreciones de animales o personas infectadas, así como tampoco se ha demostrado la transmisión sexual, ni por transfusión de sangre de infectados (23).

II.2.3.- Hospedadores

La especificidad de huésped de *B. burgdorferi sensu lato* es un resultado de selección negativa mediada por la vía alternativa del complemento (22).

En Europa, la mayoría de las especies o subtipos de *B. burgdorferi sensu lato* se especializan para infectar grupos particulares de vertebrados. (13, 23).

Por ejemplo, el serotipo 2 OspA de *Borrelia afzelii* y el serotipo 4 OspA de *Borrelia garinii* se asocian con los roedores y algunas especies de insectívoros (20), mientras que *Borrelia valaisiana* y los serotipos 3 y 5 a 8 OspA de *B. garinii* infectan a especies de aves terrestres y de aves marinas. (21).

II.3.- VECTOR

Las garrapatas vectores pertenecen a la familia *Ixodidae*, género *Ixodes*, están encuadradas dentro de un grupo particular de especies, el complejo *Ixodes ricinus*. Se trata de ácaros que presentan un escudo con la cutícula endurecida y que pueden parasitar a la mayor parte de vertebrados terrestres. Los miembros de este grupo son los principales vectores de este proceso en Norteamérica, Europa y Asia. Son garrapatas de 3 hospedadores, es decir, durante su vida se alimentan en 3 hospedadores animales diferentes. El hombre es un hospedador accidental. Carecen de ojos y poseen un rostro largo. Su rasgo más característico es la presencia de un surco anal que se encuentra bordeando el ano por la parte delantera, de forma que las ramas laterales llegan al borde del escudo o se unen entre sí, dando una forma característica de herradura. Necesitan un alto grado de humedad para su supervivencia; en cambio, no es necesaria su alimentación durante largos períodos de tiempo (34).

La especie que hemos estudiado es *Ixodes ricinus*, la cual es una especie de garrapata europea, transmisora tanto de agentes bacterianos como virales tales como el agente causal de la encefalitis transmitida por garrapatas (31). *Ixodes ricinus* se encuentra en toda Europa y en zonas limítrofes del norte de África y el Oriente Medio, se extiende hasta el norte de Islandia y tan al este como a partes de Rusia (26). Se encuentra en bosques de hoja caduca, en zonas de arbustos y pastizales húmedos y cubiertos por densa y extensa maleza. Su límite norte está determinado por la temperatura, en hábitats relativamente húmedos donde *I. ricinus* es más frecuente. Esta ausente en gran parte de la región del Mediterráneo, donde los veranos son secos (8,10).

Estas garrapatas sólo pueden sobrevivir en zonas donde haya una buena cubierta de vegetación y una alfombra de hojas caídas, para que en la base de esta vegetación se mantenga una humedad relativa superior al 80% durante los períodos del año más secos, normalmente en verano. Sin embargo, pueden sobrevivir en zonas de tipo Mediterráneo durante cortos periodos de tiempo (10, 22)

II.3.1.- Ciclo vital

El ciclo biológico de las garrapatas *I. ricinus* dura 2-4 años, aunque en climas septentrionales se alarga hasta 5-6 años (34).

Los adultos sólo se alimentan sobre grandes animales, normalmente ungulados domésticos y silvestres. Los estadios inmaduros pueden parasitar a casi todos los vertebrados terrestres, incluyendo aves y reptiles, pero las larvas se alimentan mejor que las ninfas sobre pequeños mamíferos (23, 25). En hábitats abiertos como praderas y páramos, la fuente principal de alimentación para todos los estadios es normalmente el ganado ovino y el vacuno (22).

Excluyendo el huevo hay tres estadios de desarrollo: larva, ninfa y adultos (macho y hembra). Para pasar de un estadio a otro deben alimentarse y mudar (34). Todos sus estadios aparecen casi simultáneamente a lo largo de la estación de actividad, aunque las ninfas y los adultos empiezan a alimentarse unas 4 semanas antes que las larvas. La infección por espiroquetas, por ello, es adquirida por las larvas que parasitan los roedores que habían sido infectados por la picadura de las ninfas (23).

El ciclo comienza cuando la hembra adulta pone los huevos en la vegetación, tras lo cual muere (34). Cuando las condiciones atmosféricas son favorables, nacen las larvas que miden menos de 1 mm y poseen tres pares de patas. Las larvas al final de verano comienzan a alimentarse durante 3-4 días,

generalmente sobre pequeños mamíferos silvestres y aves, y posteriormente caen al suelo donde mudan a la fase de ninfa. Estas son un poco más grandes, unos 2 mm, con cuatro pares de patas, sin abertura genital entre el segundo par de patas en la porción ventral de su cuerpo y por lo general se alimentan durante varios días sobre pequeños animales silvestres, animales domésticos o en el hombre. Cuando están repletas caen al suelo y mudan a la fase de adulto (machos o hembras) y estas en condiciones ambientales adecuadas vuelven a picar a un hospedador, preferentemente grandes animales o incluso al hombre. Los adultos se alimentarán de sangre de mamíferos y humanos hasta que en la siguiente primavera realicen la puesta de huevos e inicien el ciclo biológico de nuevo (34).

La larva raramente se encuentra infectada, por lo que es evidente que la transmisión transovárica no existe. Sin embargo, este estadio tiene un papel importante al mantener la circulación de la bacteria en la naturaleza al alimentarse de hospedadores reservorios, como roedores (5, 23). Como sólo se alimentan una vez en cada estadio, la infección normalmente la adquiere uno de ellos (por ejemplo la larva), que se alimenta sobre un hospedador reservorio de la espiroqueta y la transmite al próximo (por ejemplo la ninfa). Esto se conoce como transmisión transestadial.

El momento de actividad de la garrapata está determinado principalmente por la latencia (diapausa), este mecanismo consiste en el acondicionamiento fisiológico de las garrapatas por señales ambientales relacionadas con las condiciones ambientales futuras que permiten a las garrapatas evitar la búsqueda de hospedadores, en fases desfavorables del año. Este comportamiento impide que una parte de las garrapatas que mudan en verano, se alimenten en otoño, estas quedan en diapausa, impidiendo a las garrapatas repletas que sigan adelante con su desarrollo durante los meses de

invierno. La inducción de la diapausa se determina fundamentalmente por el fotoperiodo, la temperatura también puede tener una influencia modificadora y una variedad de factores, incluyendo la genética de población de garrapatas local (12).

II.4.- DIAGNÓSTICO DE *B.burdorferi* s.l EN *IXODES RICINUS*

II.4.1.- Aislamiento de *Borrelia* en *Ixodes ricinus*

El aislamiento de *Borrelia* se realiza según diferentes estudios en medio BSK. Las garrapatas son empapadas en etanol al 70% e individualmente se aplastan con fórceps esterilizados en tubos que contienen modificado medio BSK-II. Después de 7 a 14 días de incubación a 34°C se seleccionan los medios de cultivo positivos mediante microscopio de campo oscuro. (28).

II.4.2.- Identificación de genopecies de *Borrelia* mediante la reacción en la cadena de la polimerasa (PCR) y polimorfismo de restricción de fragmentos de ADN (RFLP)

Para la extracción de ADN, según diferentes estudios se coge 1,5 ul de muestras positivas, se lavan por centrifugación y lavado doble con 1 ml de PBSMgCl₂ (28). El sedimento se suspende en 50 ul de tampón, con MgCl₂, dNTP, cebador y Taq polimerasa y se extrae el ADN después de la incubación de los diferentes ciclos durante un total de 10-15 min de acuerdo a Gern et al. (2010)(14, 28).

PCR y fragmentos de restricción polimórficos (RFLP) se utilizan para identificar especies de *Borrelia* (14, 28). Para RFLP y PCR positiva, los productos se digieren con la endonucleasa de restricción MseI y luego son separados por electroforesis en un gel de acrilamida al 16% durante 1 h 30 min a 120 V. El ADN digerido se tiñe con bromuro de etidio (18, 28) y se visualiza bajo luz UV (18).

II.5.- DIAGNÓSTICO DE *B. burgdorferi* EN HUMANOS

El diagnóstico clínico es difícil, ya que un elevado número de enfermos no recuerdan el antecedente de la picadura de garrapata, y hasta en un 50 % de los afectados tampoco aparece la lesión cutánea característica, el eritema migrans. Las fases posteriores de la enfermedad se caracterizan por la inespecificidad de los signos y síntomas. Por lo que es necesaria la realización de pruebas de laboratorio que confirmen la existencia de infección (29).

II.5.1.- Diagnóstico directo

Se basa, en la visualización del microorganismo o su aislamiento, a partir de sangre, muestras cutáneas del eritema, líquido cefalorraquídeo (LCR), sinovial o incluso orina (4).

II.5.1.1.- Cultivo

El medio más utilizado es el BSK-H (4, 32). El cultivo es el procedimiento ideal para confirmar el diagnóstico etiológico, sobre todo en la fase inicial de la enfermedad, pero su complejidad y lentitud de crecimiento hacen que no se haga de forma habitual (4).

II.5.1.2.- Visualización

B. burgdorferi se observa difícilmente en tejidos, LCR o muestras de sinovia. Se realiza con preparaciones no teñidas, en fondo oscuro y teñidas, pudiendo ser fluorescentes o no fluorescentes (4).

II.5.2.- Diagnóstico indirecto

II.5.2.1.- Métodos de diagnóstico

Los métodos más utilizados son la inmunofluorescencia indirecta (IFI), el ELISA indirecto o de captura y el Western-Blot o Immunoblot (2, 4).

Inmunofluorescencia indirecta. No es tan reproducible como el ELISA (29) y es difícil de estandarizar. Es rentable en estadios tardíos de la enfermedad, cuando hay eritema migrans. No se ha establecido la dilución óptima, con lo que la interpretación es difícil (2, 4).

ELISA. Puede ser de tipo indirecto o de captura IgM. Tiene la ventaja de su automatización, que permite procesar un gran volumen de muestras, así como mejor estandarización. El ELISA de captura IgM ha demostrado ser más sensible (31).

Western-blot. Se utiliza para la confirmación de las pruebas de IFI y ELISA (2, 4). Su interpretación debe de hacerse de forma cuidadosa y estricta, bien de forma cualitativa (29), cuantitativa (32), o una combinación de ambos.

Antes de aplicar las pruebas serológicas, se debe excluir cualquier otra causa etiológica (27).

II.5.3.- Técnicas de amplificación genética

La detección directa de secuencias de ADN específicas mediante PCR puede ser una técnica prometedora que complementa las pruebas serológicas, aunque no está exenta de problemas (2).

Resumiendo, la PCR es una técnica sensible y específica, pero tiene el inconveniente de no haber encontrado la diana idónea, bien por falta de expresión o por variabilidad en la secuencia (2). No sustituye a la evaluación clínica ni a la serología, aunque si completa el diagnóstico cuando se obtiene un resultado positivo. Un resultado negativo no excluye la existencia de enfermedad (4).

II.6.- SITUACIÓN ACTUAL DE LA BORRELIOSIS DE LYME.

Algunos estudios han señalado la influencia del ciclo de vida de la garrapata sobre la distribución de *B. burgdorferi sensu stricto* en los Estados Unidos como consecuencia de los diferentes patrones climáticos que afectan a la fenología de la garrapata (13). El hecho de que exista un rango determinado de temperatura, al menos en Estados Unidos, se ha interpretado como el control de la sincronía de la actividad de las diferentes etapas de garrapatas por la amplitud térmica anual y la persistencia del agente patógeno en el reservorio primario (13). La abundancia de *Borrelia* en las garrapatas está determinada no sólo por el clima sino también por el período de incubación de espiroquetas en las garrapatas, lo que equivale a la duración del desarrollo de larva a ninfa (30).

Por lo tanto, los patrones de abundancia y genotipo de la distribución de las poblaciones de *B. burgdorferi sensu lato* están conformadas sustancialmente por las señales ambientales que actúan sobre las poblaciones de garrapatas, mientras que otros factores adicionales se introducen en el sistema por la dinámica de la población de hospedadores y la respuesta inmune del hospedador tanto a las bacterias como a las garrapatas (6).

Las condiciones meteorológicas como temperatura y precipitación, afectan al microclima de las garrapatas, el cual influye en la supervivencia y actividad de estas, así como en la abundancia de hospedadores y en la dinámica entre vector y hospedador (25).

Estudios anteriores clasificaron diferentes categorías de vegetación que, fueron relacionadas con la presencia de Borreliosis de Lyme y se demostró que las diferentes categorías de vegetación eran relevantes para la

supervivencia de las garrapatas y de los hospedadores reservorios (16). Así pues se demostró que la vegetación estaba estrechamente relacionada con la humedad del microclima que afecta a la supervivencia de las garrapatas (sobre todo en los estados no parásitos) y que ejercía influencia en la abundancia de garrapatas junto con la abundancia de especies hospedadoras, las cuales determinan también la abundancia de las garrapatas (10,16).

Por otra parte, el cambio climático puede ejercer diferentes efectos en la supervivencia y desarrollo de garrapatas, así como cambios en la abundancia de garrapatas y la transmisión de patógenos (25), como también ocasionan impactos en la composición de plantas y especies animales que forman parte de un hábitat, y en el inicio y duración de los periodos de actividad estacional de las garrapatas. Por ello, la variabilidad interanual de la temperatura junto con la tendencia de la amplitud térmica influyen en la actividad de la garrapata. Por ejemplo, no están activas por debajo de 6°C, impiden su actividad. La temperatura superior a 6°C inicia su actividad y la ausencia de grandes amplitudes térmicas favorece su supervivencia así como la de sus hospedadores (8, 20).

La prevalencia de la Borreliosis de Lyme varía considerablemente en diferentes países europeos, con variaciones en las escalas espaciales y temporales de la enfermedad (5). La distribución de las especies de *B. burgdorferi sensu lato*, la prevalencia de garrapatas infectadas y la naturaleza de los hábitats en focos de Borreliosis de Lyme, muestran diferencias dentro de Europa, que parecen ser relevantes para la prevalencia de Borreliosis de Lyme. (16).

Este problema es particularmente importante a la luz de la tendencia reciente del clima, a como esas variaciones climáticas pueden hacer oscilar las

poblaciones de garrapatas, y al hecho de que se trata de una enfermedad que afecta a la especie humana, para la que puede existir una prevención sencilla si conocemos la influencia real del clima sobre la prevalencia de las espiroquetas en las garrapatas (25, 26).

Los estudios previos sobre el tema se han centrado en áreas geográficas relativas a las grandes divisiones administrativas, en Europa. Estos estudios no pueden desentrañar las relaciones entre los rasgos abióticos y los patrones de prevalencia del patógeno en la garrapata vectora. Estas características abióticas son críticas y deben ser identificadas antes de llevar a cabo cualquier estudio de impacto potencial de las tendencias del clima en los procesos de transmisión de la Borreliosis de Lyme (9).

A continuación, describimos un meta-análisis de la prevalencia y la distribución de genoespecies de *B. burgdorferi sensu lato* en garrapatas *I. ricinus* en la región Paleártica occidental, basado en una revisión sistemática de la literatura. Este análisis se restringe explícitamente a la zona de distribución de *I. ricinus*, aunque la bacteria puede ser transmitida por *Ixodes persulcatus* al este de la zona objetivo.

III.- OBJETIVOS

III.- OBJETIVOS

- Determinación, mediante un meta-análisis, de la prevalencia de infección por *B.burdorferi sensu lato* en garrapatas ninfas del genero *Ixodes ricinus*, para Europa en el periodo comprendido entre los años 2000 a 2011.
- Clasificación de los diferentes países y áreas geográficas de Europa en cuatro niveles de prevalencia obtenidas (baja, moderada, alta y muy alta) que se identificaran a niveles de riesgo para la salud pública.
- Identificación de las principales variables abióticas del hábitat que influyen en la abundancia y supervivencia de las poblaciones de garrapatas en estudio.
- Estudio de la relación entre los niveles de prevalencia definidos y las variables abióticas como elementos de riesgo de infección por *Borrelia* (asociación estadística).
- Elaboración de un análisis de riesgo cualitativo de infección por *Borrelia*, niveles de riesgo (inapreciable, posible, moderado y elevado), en función de los factores de riesgo abióticos identificados y la distribución en niveles de prevalencia.

IV.- MATERIAL Y MÉTODOS

IV.- MATERIAL Y MÉTODOS

Para definir la prevalencia de *Borrelia* en garrapatas y definir el riesgo de infección para el hombre en Europa, se procedió a realizar el siguiente protocolo de trabajo:

IV.1.- COLECCIÓN DE DATOS

En primer lugar, se debía conocer la prevalencia de *Borrelia burgdorferi* en garrapatas, la cual se obtuvo de los datos publicados entre los años 2000 y 2011.

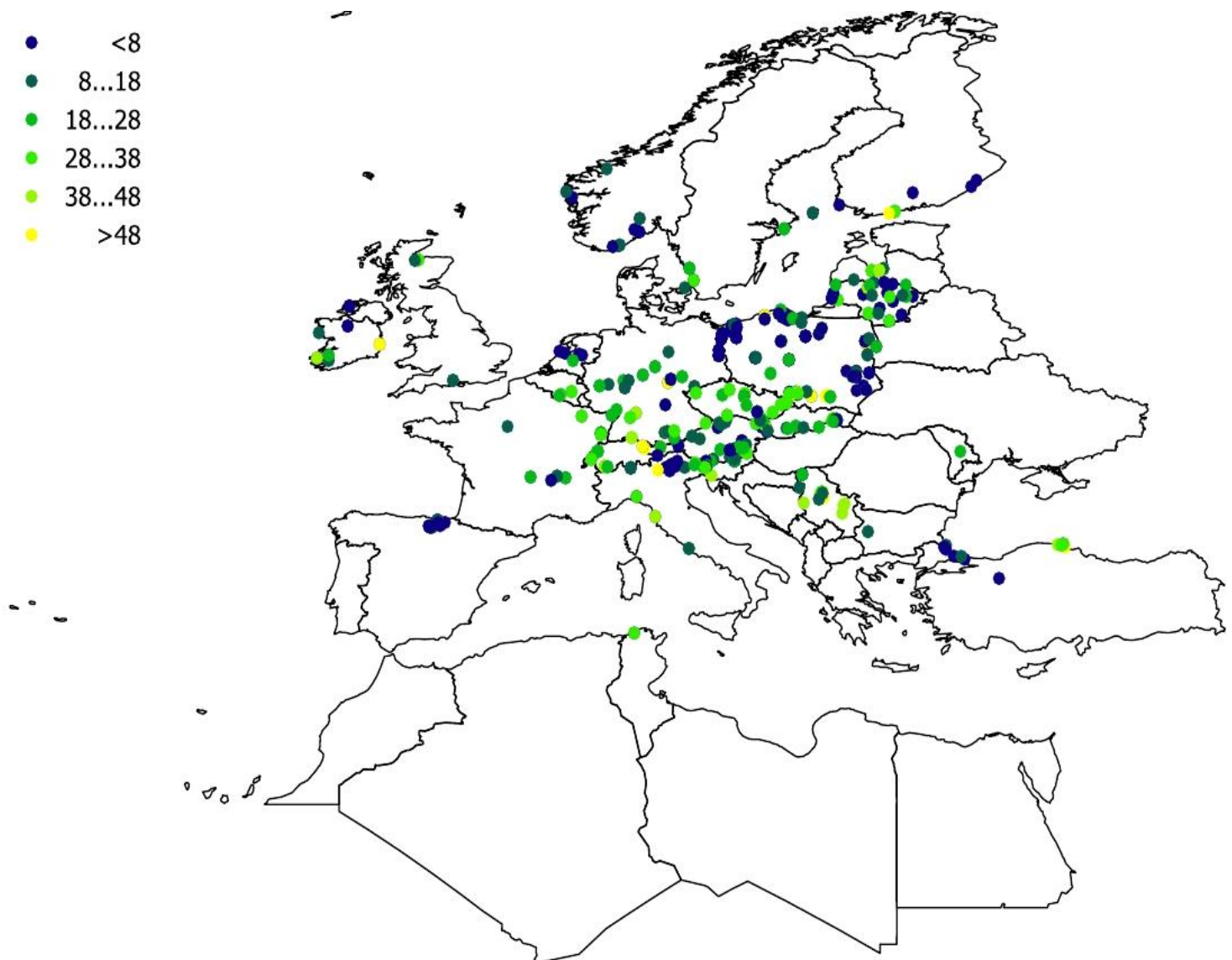
Para que los resultados obtenidos de este trabajo fueran fiables, fueron seleccionados aquéllos estudios en los que se daban las coordenadas exactas del lugar donde se habían capturado más de 100 garrapatas en estado de ninfa procedentes del suelo y/o vegetación de la zona.

La observación de garrapatas procedentes de animales solamente produce una contaminación con el ADN de los posibles patógenos que pueda tener el hospedador, falseando la estadística. De la misma forma, la inclusión de los adultos en los protocolos, introduce un ruido estadístico por su alimentación en más de un hospedador.

En cuanto al número de garrapatas, se consideraron como validas más de 100 ninfas, tras evaluar los estudios de campo ya publicados.

La evaluación completa de la bibliografía usada en este estudio, permitió incluir un total de 607 lugares en Europa. Tras la aplicación de las condiciones restrictivas, se usó un total de 132 lugares, con un total de 38447 ninfas.

Figura 1: Distribución geográfica de los informes sobre la prevalencia de *Borrelia burgdorferi* s.l. en garrapatas *Ixodes ricinus*, que se ha considerado para el presente estudio.



IV.1.1.- Método de detección de *B.burgdorferi*

Antes de proceder a evaluar la prevalencia de *B. burgdorferi* en garrapatas, es necesario verificar cual es el mejor método de detección de la misma y corregir los resultados de prevalencia, si es necesario.

Los métodos que se usan generalmente para detectar *B.burgdorferi sensu lato* en garrapatas, son el cultivo en medio Barbour-Stoener-Kelly (BSK), microscopia de contraste y campo oscuro, inmunofluorescencia y PCR.

IV.2.- ESTABLECIMIENTO DE LA RELACIÓN ENTRE FACTORES ABIÓTICOS Y PREVALENCIA DE INFECCIÓN EN GARRAPATAS

IV.2.1.- Clasificación de los niveles de prevalencia

Una vez observados los valores de prevalencias publicados, se establecieron cuatro niveles de infección en garrapatas (bajo, moderado, alto y muy alto), de acuerdo a los valores obtenidos tras analizar la distribución de sus datos en cuartiles.

Primer cuartil $\rightarrow \leq 3,9 \%$ (prevalencia baja)

Segundo cuartil $\rightarrow > 3,9 \%$ y $\leq 9,46 \%$ (prevalencia moderada)

Tercer cuartil $\rightarrow > 9,46 \%$ y $\leq 15,67 \%$ (prevalencia alta)

Cuarto cuartil $\rightarrow > 15,67$ (prevalencia muy alta)

IV.2.2.- Obtención de los factores abióticos

Los factores que fueron analizados en su relación con la prevalencia de infección en garrapatas para el análisis de riesgos son variables descriptivas del hábitat (temperatura y vegetación).

Los datos de estas variables se han obtenido a partir de imágenes de satélite (serie MODIS, resolución 1 km.). No existe ninguna forma de obtener una estimación adecuada de la humedad en el suelo, que afecta la supervivencia de las garrapatas. En su lugar, se utiliza el Normalized Derived Vegetation Index (NDVI). Ambas series de datos se obtuvieron de <https://lpdaac.usgs.gov/content/view/sitemap/2> entre los años 2000 y 2011. Para homogeneizar las series de datos de 11 años y eliminar el ruido de fondo derivado de intervalos temporales cortos, se procedió a su filtrado mediante

componentes principales (ACP). El método está diseñado para reducir el número de variables original (240 en nuestro caso) sin perder la variabilidad de la serie de datos. Las variables del hábitat sometidas a comparación con los datos de prevalencia en garrapatas fueron las temperaturas y NDVI mínimas, máximas y medias del periodo 2000-2011, así como la temperatura y NDVI medios de los meses con valores mínimos y máximos absolutos. Estos datos se complementaron con los ejes principales de una reducción ACP.

Tabla I, Significado de las variables

T	Temperatura media absoluta
T1	Temperatura mínima absoluta
T2	Temperatura media de las mínimas
T3	Temperatura máxima de las medias
T4	Temperatura máxima absoluta
NDVI (máx, mean, min)	NDVI máximo, mínimo y medio
PCT1, 2 y 3	Componentes principales a partir de los datos de temperatura
PCNDVI1, 2 y 3	Componentes principales a partir de los datos de NDVI
Amp NDVI	Amplitud (máximo-mínimo) del NDVI
Amp T	Amplitud (máximo-mínimo) de la temperatura
NDVI20	valor del percentil 20 de la distribución anual de NDVI
NDVI80	valor del percentil 80 de la distribución anual de NDVI
T20	valor del percentil 20 de la

	distribución anual de la temperatura
T80	valor del percentil 80 de la distribución anual de la temperatura
Tacc	Temperaturas acumuladas
Tacc_6	Temperaturas acumuladas por encima de 6°C (que es la temperatura de activación de las garrapatas)
Tacc_12	Temperaturas acumuladas por encima de 12°C (que es la temperatura de inicio de actividad de las garrapatas)
W20NDVI	semana del año en la que se aprecia el percentil 20 de NDVI
W80NDVI	semana del año en la que se aprecia el percentil 80 de NDVI
W20T	semana del año en la que se aprecia el percentil 20 de T
W80T	semana del año en la que se aprecia el percentil 80 de T

IV.2.3.- Análisis estadístico

El análisis estadístico se ha realizado para conocer la asociación de diferentes niveles de prevalencia de *Borrelia* en garrapatas con unas determinadas variables del hábitat.

Para llevar a cabo todos los cálculos de la distribución de prevalencias, y asociación con los factores abióticos estudiados, se realizaron diferentes análisis de tipo estadístico utilizando el programa informático EPI INFO 2007 a partir de las bases de datos organizadas en el programa EXCEL. Las pruebas utilizadas han sido:

- Distribución de la media, mediana y cuartiles (25 y 75) para cada nivel de infección en garrapatas (prevalencia muy alta, alta, media o baja).
- Coeficiente de correlación del valor del factor de riesgo con la prevalencia de infección en garrapatas o bien la significación estadística mediante ANOVA para la prevalencia de infección baja, media, alta y muy alta con los valores de cada factor.

Fueron consideradas significativas aquellas distribuciones cuyos valores de p son menores o iguales a 0,05.

Los factores que estaban significativamente relacionados con la prevalencia, son los que nos interesan para nuestro análisis de riesgo, por tanto fue para ellos para los que fueron establecidos los niveles de riesgo.

IV.2.3.1.- Análisis de riesgo

El análisis de riesgo desarrollado fue de tipo cualitativo basado en los modelos diseñados por la OIE y AFSSA (1,7). Los riesgos se estimaron mediante el estudio de la relación de los diferentes factores abióticos identificados como factores de riesgo potenciales con los niveles de prevalencia de infección en garrapatas, de forma que se analizó la correspondencia entre los cuatro niveles de prevalencia establecidos y los valores obtenidos para los factores abióticos mencionados. A partir de esa relación se establecieron los cuatro niveles de riesgo correspondientes (inapreciable, posible, moderado y elevado) para cada variable de acuerdo con los estándares de la OIE para el análisis de riesgos en movimientos de población y que se identificaban como los niveles de riesgo de infección en función de las características de los factores abióticos de un área geográfica.

Los niveles de riesgo fueron establecidos para cada factor estudiado a partir de la distribución de los valores de esos factores y su relación con los niveles de prevalencia, definiendo esos riesgos dentro de los rangos (cuartiles 25 y 75) de variabilidad de cada factor abiótico en los diferentes niveles de prevalencia y ajustándolos, posteriormente, de forma observacional.

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1.- Distribución de los valores de cada variable abiótica en función de los niveles de prevalencia de *Borrelia spp* en garrapatas

Los valores de cada una de las variables abióticas se indican en las tablas según los niveles de prevalencia establecidos. (Tablas II, III, IV, V y VI).

Tabla II, media de la distribución de las VARIABLES ABIÓTICAS para diferentes niveles de prevalencia de *Borrelia spp.* en ninfas de *Ixodes ricinus*. Los datos de temperaturas se expresan en grados Kelvin (los originales en las imágenes de MODIS) y los datos de NDVI (vegetación) son cantidades sin unidad (varia en un rango entre 0 y 1).

	PREVALENCIA BAJA	PREVALENCIA MODERADA	PREVALENCIA ALTA	PREVALENCIA MUY ALTA
T	280,55	281,86	281,7	281,92
T1	266,65	268,17	267,88	268,92
T2	276,63	277,81	277,7	278,26
T3	284,46	285,91	285,69	285,58
T4	295,84	297,1	296,94	295,83
Max NDVI	0,61	0,62	0,61	0,62
Mean NDVI	0,44	0,45	0,46	0,49
Min NDVI	0,27	0,29	0,32	0,33
PCT1	985,84	990,65	990,03	989,48
PCT2	4,66	6,48	5,55	8,56
PCT3	2,98	2,70	2,69	2,09
PNDVI 1	1,58	1,61	1,62	1,70
PNDVI 2	0,13	0,09	0,05	0,06
PNDVI 3	0,06	0,07	0,07	0,04
Amp NDVI	0,34	0,33	0,30	0,28
Amp T	24,73	23,72	23,91	21,4
Max_ndvi	0,61	0,62	0,61	0,62
Max_t	291,28	292,40	292,29	291,98
Min_ndvi	0,27	0,29	0,32	0,33
Min_t	266,54	268,68	268,38	270,58
NDVI20	0,34	0,35	0,38	0,4
NDVI80	0,54	0,55	0,55	0,57
T20	271,50	273,42	273,16	274,86

T80	286,33	287,65	287,51	287,7
Tacc	8134,99	8742,49	8645,84	8711,52
Tacc_6	198,30	212,69	210,32	212,1
Tacc_12	127,73	137,85	141,91	144,9
W20ndvi	12,795	12,08	11,36	11,8
W20t	10,62	11,19	11,41	13,6
W80t	17,37	16,81	17,18	16,5
W80ndvi	14,99	14	13	16,1
Wt2080	24,01	24	23,41	21,9
Wndvi2080	24,23	25,92	27,64	24,1

El análisis de estos datos ha puesto de manifiesto que la temperatura mínima absoluta anual (T1) y la media de las máximas (T3) tienen diferentes valores para los cuatro niveles de prevalencia establecidos; el menor mínimo absoluto se asocia a prevalencia baja y el mayor mínimo absoluto a prevalencia muy alta. La menor media máxima se asocia a prevalencias bajas. El valor más bajo de la media absoluta anual (T) coincide con prevalencias bajas y el valor más alto con prevalencias muy altas. La temperatura media mínima (T2) y la temperatura máxima absoluta anual (T4) no están bien correlacionadas con los niveles de prevalencia establecidos.

La reducción mediante un análisis de componentes principales (ACP) de las variables mensuales de temperatura proporcionó un mejor conjunto de descriptores de las tasas de prevalencia clasificadas. Los valores del primer eje principal están correlacionados directamente con la temperatura media, y los valores más bajos de este eje se asocian a prevalencias bajas. El segundo eje está inversamente relacionado con la amplitud de la temperatura. Los resultados indican que hay una menor variabilidad estacional para valores de prevalencia altos y una mayor variabilidad asociada a una prevalencia baja. El tercer eje está inversamente relacionado con las temperaturas mínimas del invierno. Las zonas con prevalencia baja tienden a estar relacionadas con

zonas de menor temperatura invernal, mientras que el resto de los cuartiles tenía correlativamente valores más altos para este eje.

Las variables derivadas de las características de la vegetación no son descriptores adecuados de los rangos de prevalencia de *Borrelia* si se usaban por separado. Sin embargo, y aunque estos valores no sean significativos, la prevalencia de *Borrelia* en garrapatas aumenta siguiendo el marcador del NDVI.

Las amplitudes medias de temperatura y de NDVI muestran valores mayores en zonas en la que la prevalencia es menor, y disminuyen en zonas con mayor prevalencia. En resumen, en áreas en las que la temperatura media anual se mantiene por encima de unos márgenes, en las que los inviernos no son extremos, y en las que no existe una gran variabilidad anual, cabe esperar una mayor prevalencia de *Borrelia* en las garrapatas, muy probablemente por la mayor abundancia de estas. La implicación del NDVI en estos resultados se debe a la presencia de un mayor contenido de agua en el suelo, que también aumenta la supervivencia de las garrapatas.

Tabla III, valores de las VARIABLES ABIÓTICAS para el nivel de prevalencia baja

VARIABLES	MEDIA	CUARTIL 1	MEDIANA	CUARTIL 3
T	280,55	279,97	280,56	281,3
T1	266,65	265,18	266,54	266,99
T2	276,63	276	276,6	277,44
T3	284,46	283,45	284,68	285,47
T4	295,84	295,18	296,05	297,19
Max NDVI	0,61	0,59	0,61	0,64
Mean NDVI	0,44	0,43	0,44	0,47
Min NDVI	0,27	0,23	0,26	0,31
PCT1	985,84	982,18	986,75	989,46
PCT2	4,66	1,65	4,32	6,53
PCT3	2,98	2,77	3,53	4,1
PNDVI 1	1,58	1,51	1,58	1,68
PNDVI 2	0,13	0,10	0,16	0,19
PNDVI 3	0,06	0,02	0,08	0,11
Amp NDVI	0,34	0,3	0,36	0,38
Amp T	24,73	23,18	25,48	26,14
Max_ndvi	0,61	0,59	0,61	0,64
Max_t	291,28	290,65	291,88	292,25
Min_ndvi	0,27	0,23	0,26	0,31
Min_t	266,54	264,84	265,98	267,07
NDVI20	0,34	0,31	0,33	0,38
NDVI80	0,54	0,53	0,54	0,57
T20	271,49	270,17	271,16	272,31
T80	286,33	285,6	286,47	286,92
Tacc	8134,99	7854,09	8064,97	8356,39
Tacc_6	198,3	192,5	196	206,5
Tacc_12	127,73	129,5	133	143,5
W20ndvi	12,8	11	13	14,5
W20t	10,62	9	9	12
W80t	17,37	16	18	18,5
W80ndvi	14,99	12,5	14	17,5
Wt2080	24,014	24	25	25,5
Wndvi2080	24,22	22	24	27,5

Tabla IV, valores de las VARIABLES ABIÓTICAS para el nivel de prevalencia moderada

VARIABLES	MEDIA	CUARTIL 1	MEDIANA	CUARTIL 3
T	281,86	280,32	281,4	282,99
T1	268,17	266,48	267,045	269,25
T2	277,81	276,78	277,39	278,26
T3	285,91	283,98	285,38	287,95
T4	297,1	295,04	296,01	300,15
Max NDVI	0,62	0,56	0,63	0,67
Mean NDVI	0,45	0,43	0,46	0,49
Min NDVI	0,29	0,20	0,30	0,34
PCT1	990,65	982,14	989,03	998,1
PCT2	6,49	0,45	6,43	9,79
PCT3	2,7	2,09	3,23	4,11
PNDVI 1	1,61	1,53	1,65	1,73
PNDVI 2	0,086	0,02	0,08	0,2
PNDVI 3	0,07	0,02	0,06	0,12
Amp NDVI	0,33	0,24	0,34	0,29
Amp T	23,72	20,49	23,86	27,67
Max_ndvi	0,62	0,56	0,63	0,67
Max_t	292,4	291,23	292,2	294,61
Min_ndvi	0,29	0,20	0,30	0,34
Min_t	268,68	265,46	266,91	272,06
NDVI20	0,35	0,3	0,37	0,39
NDVI80	0,55	0,51	0,56	0,6
T20	273,42	271,07	271,98	276,02
T80	287,66	285,94	287,55	289,05
Tacc	8742,49	8027,06	8356,79	9236,19
Tacc_6	212,69	196	203	255,5
Tacc_12	137,85	129,5	140	178,5
W20ndvi	12,08	11,5	12,5	13
W20t	11,19	9,5	10	15
W80t	16,81	16	17	18
W80ndvi	14	11	14	16,5
Wt2080	24	22,5	24,5	26
Wndvi2080	25,92	23,5	25,5	30

Tabla V, valores de las VARIABLES ABIÓTICAS para el nivel de prevalencia alta

VARIABLES	MEDIA	CUARTIL 1	MEDIANA	CUARTIL 3
T	281,7	280,86	281,58	282,74
T1	267,88	265,77	268,12	269,34
T2	277,7	276,84	277,85	278,27
T3	285,69	284,23	285,67	286,97
T4	296,94	295,07	296,89	299,26
Max NDVI	0,61	0,57	0,62	0,67
Mean NDVI	0,47	0,41	0,48	0,52
Min NDVI	0,32	0,24	0,31	0,39
PCT1	990,03	985,08	990,08	994,65
PCT2	5,55	1,01	5,25	9,08
PCT3	2,69	1,94	2,72	3,54
PNDVI 1	1,62	1,46	1,67	1,82
PNDVI 2	0,05	-0,02	0,07	0,14
PNDVI 3	0,07	0,02	0,08	0,13
Amp NDVI	0,3	0,28	0,31	0,35
Amp T	23,91	21,78	24,07	27,49
Max_ndvi	0,61	0,57	0,62	0,67
Max_t	292,29	291,11	292,22	294,3
Min_ndvi	0,32	0,24	0,31	0,39
Min_t	268,38	265,28	268,53	270,98
NDVI20	0,38	0,3	0,37	0,44
NDVI80	0,55	0,51	0,56	0,59
T20	273,16	271,05	273,33	274,91
T80	287,51	286,21	287,54	288,77
Tacc	8645,84	8273,88	8353,81	9196,42
Tacc_6	210,32	210	203	224
Tacc_12	141,91	136,5	140	164,5
W20ndvi	11,36	11	11	12,5
W20t	11,41	9,5	12	14
W80t	17,18	16,5	17	18
W80ndvi	13	10,5	13	15,5
Wt2080	23,41	22	23,5	25,5
Wndvi2080	27,64	23,5	28,5	31,5

Tabla VI, valores de las VARIABLES ABIÓTICAS para el nivel de prevalencia muy alta

VARIABLES	MEDIA	CUARTIL 1	MEDIANA	CUARTIL 3
T	281,92	281,67	281,75	282,78
T1	268,92	268,83	268,25	270,22
T2	278,26	278,21	278,39	278,61
T3	285,58	284,92	285,42	286,95
T4	295,83	294,40	295,89	297,67
Max NDVI	0,62	0,54	0,63	0,69
Mean NDVI	0,49	0,44	0,5	0,55
Min NDVI	0,33	0,31	0,34	0,4
PCT1	989,47	987,23	989,92	994,12
PCT2	8,56	8,31	9,25	10,67
PCT3	2,09	0,98	2	3,29
PNDVI 1	1,7	1,55	1,78	1,9
PNDVI 2	0,06	0,01	0,07	0,15
PNDVI 3	0,04	0,02	0,051	0,07
Amp NDVI	0,28	0,24	0,28	0,33
Amp T	21,4	19,56	20,74	23,32
Max_ndvi	0,62	0,54	0,63	0,69
Max_t	291,98	290,78	291,56	293,4
Min_ndvi	0,33	0,31	0,34	0,4
Min_t	270,58	270,99	271,24	271,4
NDVI20	0,4	0,36	0,39	0,46
NDVI80	0,57	0,5	0,59	0,63
T20	274,86	274,94	275,25	275,65
T80	287,7	286,7	287,35	288,86
Tacc	8711,52	8346,1	8751,76	9208,96
Tacc_6	212,1	203	213,5	224
Tacc_12	144,9	140	144,5	154
W20ndvi	11,8	9	11	13,5
W20t	13,6	12	13	14,75
W80t	16,5	16	16,5	17,5
W80ndvi	16,1	16	16	16,75
Wt2080	21,9	21	22	22,75
Wndvi2080	24,1	21,5	24,5	25,75

En sitios donde la prevalencia era mayor se observan amplitudes térmicas intermedias, la media más alta y las temperaturas máximas dentro de los márgenes adecuados para la garrapata vector. Las proporciones de prevalencia más bajas se asociaron con las mayores amplitudes térmicas y las más bajas temperaturas máximas y mínimas. Los sitios de prevalencia media y alta se asocian con una temperatura invernal media y baja amplitud térmica, lo que resulta en bajos valores máximos de verano.

Los hallazgos en el análisis de las variables básicas se ven sustentados por los resultados del análisis de componentes principales (ACP). De este modo, los rasgos del medio ambiente indican que una larga temporada de actividad de las garrapatas y una baja mortalidad de las garrapatas son indicadores de una alta prevalencia del patógeno. Sin embargo las temperaturas extremadamente bajas, la amplia variabilidad térmica, y el alto déficit de saturación de agua ambiental (bajo índice de NDVI) son marcadores de baja abundancia de garrapatas y por tanto de bajas tasas de contacto entre las garrapatas y los reservorios de patógenos.

V.2.- Asociación entre la distribución de los valores de las variables abióticas estudiadas y la prevalencia de *Borrelia spp* en garrapatas

El estudio de la asociación estadística de los niveles de prevalencia de infección con cada factor abiótico estudiado se observa en la *tabla VI*. Se han considerado como significativos aquellas asociaciones cuyo valor del estadístico p es menor o igual a 0,05.

Tabla VI, asociación estadística de las VARIABLES ABIÓTICAS estudiadas con los niveles de prevalencia observados

FACTOR	p (ANOVA) ≤ 0,05
T	0,0042
T1	0,0081
T2	0,00067
T3	0,0232
T4	0,1939
NDVI me.	0,1670
NDVI ma.	0,9722
NDVI mi	0,0847
PCA1	0,0306
PCA2	0,0521
PCA3	0,4681
PNDVI1	0,3267
PNVDI2	0,0601
PNVDI3	0,6000
Amp NDVI	0,0989
Amp T	0,1061
Max NDVI	0,8863
Max T	0,0991
Min NDVI	0,0516
min T	0,0014
NDVI 20	0,0638
NDVI 80	0,5233
T 20	0,0006
T 80	0,0064
Tacc	0,0436
Tacc 6	0,0463
Tacc 12	0,1573

W20 NDVI	0,0494
W 20 T	0,0078
W 80 T	0,1425
W 80 NDVI	0,0664
W T2080	0,0047
W NDVI 2080	0,0022

De este análisis se deduce que algunas de las características ambientales de la región paleártica occidental están claramente relacionadas con el patrón geográfico de variación en la prevalencia de *B. burgdorferi sensu lato* en las garrapatas.

V.3.- Diseño del análisis de riesgo cualitativo de infección por *Borrelia spp.* en garrapatas en función de los valores de las variables abióticas estudiadas

A partir de los datos de la distribución de los valores de cada variable abiótica para cada uno de los cuatro niveles de prevalencia definidos, y considerando los resultados de la asociación estadística y un posterior ajuste de forma observacional mediante la acumulación en nubes de puntos, se definieron los valores de cada variable que determinaban diferentes niveles de riesgo de infección en garrapatas. Los resultados obtenidos se observan en la *tabla VII*.

Tabla VII, Niveles de riesgo introducido por las diferentes variables abióticas estudiadas para la existencia de infección por *Borrelia spp* en garrapatas

	ELEVADO	MODERADO	POSIBLE	INAPRECIABLE
T	282,5 - 286	281,5 - 282,5	279,5 - 281,5	menor 279,5 o mayor 286
T1	268,5 - 274	267 - 268,5	266 - 267	menor 266
T2	mayor 278	277-278	276,5-277	menor 276,5
T3	mayor 285,5	284-285,5	283 - 284	menor 283
T4	mayor 295	294-295	293-294	menor 293
NDVI me.	0,20-0,30	0,30-0,37	0,37-0,42	0,42-0,48
NDVI ma.	0,60-0,64	0,64-0,68 o 0,58-0,60	0,54-0,58 o mayor 0,68	menor 0,54
NDVI mi	0,20-0,27	0,17-0,20 o 0,27-0,30	0,14-0,17 o 0,30-0,40	menor 0,17 o mayor 0,40
PCA1	mayor 990	990 - 985	985 - 983	menor 983
PCA2	mayor 8	8 - 2	2 - 0,5	no hay uniformidad
PCA3	mayor 3,5	3-3,5	1,5-3	(-3)-1,5
PNDVI1	1,5-1,8	1,4-1,5	1,3-1,4	1,1-1,3
PNVDI2	0,12-0,20	0,08-0,12	mayor 0,20	(-0,25)-0,08
PNVDI3	0,04-0,08	0,08-0,1	0,10-0,14	menor 0,04
Min NDVI	0,40 - 0,35	0,35 - 0,30	0,30 - 0,25	menor 0,25
Min T	mayor 270	270 - 267	267 - 265	menor 265
T20	mayor 275	275 - 273,5	273,5 - 271,5	menor 271,5
T80	mayor 288	288 - 287	287 - 286	menor 286
Tacc	mayor 8700	8700 - 8500	8500 - 8200	menor 8200
Tacc 6	mayor 215	215 - 210	210 - 205	menor 205
W 20 NDVI	mayor 13	13 - 11	13 - 11	mayor 13
W 20T	menor 12	mayor 12	mayor 12	menor 12
WT2080	menor 22	22 - 23,5	23,5 - 25	mayor 25
WNDVI2080	menor 25	mayor 25	mayor 25	menor 25

Todos los resultados relativos al riesgo por *Borrelia spp.* en garrapatas coinciden en indicar la asociación de un mayor riesgo en un intervalo de [281,67 – 282,78] K de temperatura media anual, una temperatura mínima anual de [268,83 – 270,22] K, cuando la media mínima era de [278,21 - 278,61] K y con medias máximas de [284,92 - 286,95] K. Estos datos son similares cuando los resultados de temperatura se resumen mediante ACP, es decir, los mayores riesgos aparecen en un intervalo dado de temperaturas, como muestra PCA1 [987,23- 994,12] indicando que el mayor riesgo de temperaturas

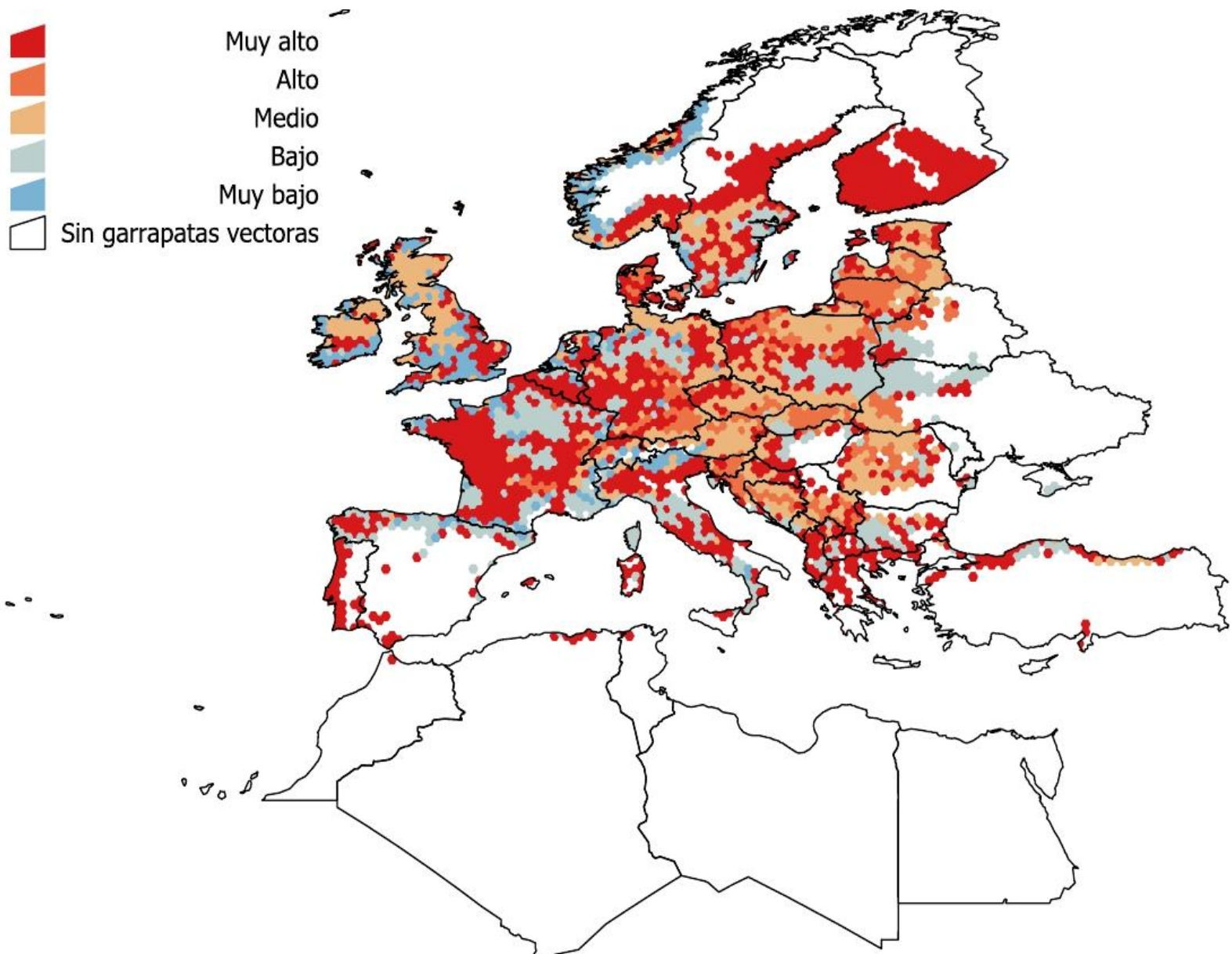
medias se mueve en ese rango y PCA2 [8,31-10,67] que indica la menor amplitud térmica produce el mayor riesgo.

Los estudios que se han publicado hasta la fecha, acerca de la prevalencia de *Borrelia* en garrapatas tienen un enfoque extremadamente regional, que no permite ver el conjunto de los datos y de la distribución de la variable a estudiar.

Así, se ha indicado que la zona geográfica con mayor prevalencia de *Borrelia* era el centro y este de Europa (16).

El mapa de clasificación de Europa debe ser considerada como la mejor explicación de la influencia de las variables abióticas en la prevalencia de garrapatas infectadas, pero no debe identificarse este hecho con un mapa del riesgo para la especie humana (9), ya que este dependerá finalmente de la posibilidad de contacto entre el hombre y la garrapata. No obstante, la prevalencia de infección de *Borrelia spp.* en garrapatas si que es considerado un elemento más de riesgo para la enfermedad de Lyme (32), pero dependiendo de las tasas de contacto de las garrapatas infectadas y los seres humanos, con otros factores, en parte si representa un elemento de información sobre la evolución de las tasas de incidencia de la enfermedad en Europa.

Figura 2: Distribución del riesgo de la infección por *B. burgdorferi* s.l. en garrapatas *I. ricinus* según los factores climáticos analizados. La figura muestra una descripción del impacto de los factores abióticos sobre la prevalencia esperada de la infección en las garrapatas vectoras.



Los patrones de distribución de *B. burgdorferi* sensu lato mostraron una clara relación con gradientes de temperatura y características de la vegetación. Estos gradientes son poderosos agentes impulsores de la abundancia de garrapatas, la estacionalidad, y el predominio de los diferentes hospedadores de espiroquetas, dando lugar a comunidades altamente variables de hospedadores en la región objetivo según *Dizij A., Kurtenbach K. y Gatewood A. G., et al.* en estudios anteriores (6,13, 25).

El cambio climático global que induce temperaturas mínimas más altas y primaveras más tempranas pueden afectar también a aspectos de la fenología de las garrapatas, como la densidad de su distribución local, las tasas de supervivencia y su propagación hacia zonas de mayor altitud y en latitudes más al norte. Una mayor abundancia de garrapatas propiciada por factores climáticos y por el aumento concomitante en la densidad de vertebrados salvajes y domésticos, junto con la expansión de hábitat adecuados para los huéspedes reservorio resulta, según estudios realizados, en una mayor circulación de *Borrelia burgdorferi* y como consecuencia en una mayor incidencia de la enfermedad de Lyme (33). Esta última parte fue demostrada según Halos et. al, en un estudio sobre la prevalencia *B. burgdorferi sensu lato*, donde aparecía más infección por *Borrelia spp.* en las garrapatas de bosque que en las garrapatas de pastos, lo cual demuestra que los reservorios principales, roedores y aves, son más abundantes en los bosques que en los pastizales; así mismo se encontró mayor infección de *Borrelia spp.* en garrapatas de pastos con alto porcentaje de arbustos o pastizales rodeados de bosque, donde son abundantes los reservorios (18).

Estudios teóricos indican que interacciones complejas entre factores como cambios genéticos en el patógeno, el vector o el huésped, la tasa de

supervivencia y la abundancia de las garrapatas o la mayor exposición de los seres humanos a las picaduras debido a un aumento de actividad al aire libre inciden en las fluctuaciones espacio-temporales de la abundancia de las diferentes genopecies de *Borrelia burgdorferi* y de la enfermedad de Lyme. (33).

El carácter estacional de la actividad de las garrapatas determina la estacionalidad de la LB. La mayoría de los casos se manifiestan a mediados o finales de verano y esta es en función de la aparición de las garrapatas en la vegetación, la presencia de personas en ese hábitat y el tiempo de incubación de la enfermedad (12).

Por lo tanto, *B. burgdorferi* sensu lato puede ser considerado como un grupo de diferentes poblaciones ecológicas, o ecotípos, cuya distribución y abundancia son moldeadas por fuerzas climáticas, que también impulsan la dinámica de las garrapatas vectoras, junto con la especie de hospedador y su abundancia. Factores abióticos, tales como la temperatura, déficit de saturación de la atmósfera y horas de luz, afectan en el comportamiento de la fenología de las garrapatas, proporcionando la variabilidad en el ciclo de vida de acuerdo al área de distribución geográfica de la garrapata. Aunque la estructura de las comunidades de hospedadores determina la estructura de la población de los genotipos *B. burgdorferi* sensu lato en Europa, el clima tiene un impacto definitivo en la distribución de las diferentes cepas de *I. ricinus*, y por tanto en la modulación de la prevalencia de *B. burgdorferi* sensu lato.

VI.- RESUMEN

VI.- RESUMEN

La distribución de la media y cuartiles (25-75) de los valores de las variables abióticas para los cuatro niveles de prevalencia ya demostraba la asociación de los valores de algunas de las variables con los niveles de prevalencia, como por ejemplo las mayores prevalencias se asociaban con la temperatura media mas alta, así como a prevalencias bajas se observaban las temperaturas máximas y mínimas más bajas, junto con mayores amplitudes de temperatura.

Tras confirmar que variables estaban estadísticamente relacionadas con los niveles de prevalencia, se estableció el análisis de riesgo cualitativo de infección en garrapatas, definiendo los valores de cada variable que determinaban los cuatro niveles de riesgo, según la distribución de esos valores dentro de los rangos (cuartiles 25 y 75) en los diferentes niveles de prevalencia. Se obtuvo el mayor riesgo de infección en garrapatas con temperaturas medias y mínimas anuales más altas, con la mayor temperatura media máxima dentro de la temperatura de actividad de la garrapata y en lugares con menores amplitudes.

Por tanto se demuestra la asociación de que garrapatas de una zona tengan mayor o menor riesgo de infección por *Borrelia spp.* está determinado por factores abióticos que influyen tanto en el ciclo de la garrapata como en el mantenimiento de hospedadores reservorios, que permiten la circulación de la infección.

VII.- CONCLUSIONES

VII.- CONCLUSIONES

- ❖ Algunos factores climáticos como la temperatura media anual, la amplitud térmica y el déficit de saturación de agua en el aire son indicadores de la mayor o menor prevalencia de *B.b.s.l.* en las garrapatas *I. ricinus*. de la región Paleártica de una zona.
- ❖ Los gradientes de temperatura y vegetación modulan la abundancia de garrapatas, su estacionalidad y el predominio de hospedadores reservorios, por tanto modulan el contacto entre reservorio-garrapata y por consiguiente condicionan la prevalencia de infección por *Borrelia* en garrapatas *I.ricinus*.
- ❖ Los factores que promueven una actividad de las garrapatas sostenida en el tiempo, estable, sin amplias variaciones ni mortalidad de las mismas, provocan un aumento del riesgo de infección por las mismas. Sin embargo, las temperaturas extremas, la amplia variabilidad térmica y un alto déficit de saturación de agua marcan una baja abundancia de garrapatas y por tanto bajas tasas de contacto entre garrapatas y reservorios.
- ❖ Estos resultados no deben evaluarse como una aproximación directa al riesgo de la enfermedad en la especie humana, sino como la interpretación del impacto del clima en los componentes de la transmisión de la enfermedad. Otros factores de tipo social condicionan la diferente incidencia de la enfermedad.

VIII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA).** 2009. Une méthode qualitative d'estimation du risque en santé animale. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), Bialec-Nancy, France.
2. **Assous MV.** Méthodes du diagnostic biologique au cours des différentes manifestations de la borréliose de Lyme. Médecine et maladies infectieuses. 2007; 37:487–495. France.
3. **Center for Disease Control and Prevention (CDC).** 2007. Departament of Health and Human Services. Lyme disease.
4. **De Martino SJ.** Place des méthodes biologiques dans le diagnostic des différentes manifestations de la borréliose de Lyme. Quelles sont les techniques? Quelles sont celles disponibles actuellement? Médecine et maladies infectieuses. 2007; 37:496–506. France.
5. **Derdáková M, and Lencáková D.** Association of genetic variability within the *Borrelia burgdorferi sensu lato* with the ecology and epidemiology of Lyme borreliosis in Europe. Ann. Agric. Environ. Med. 2005.12:165–172.
6. **Dizij A, and Kurtenbach K.** *Clethrionomys glareolus*, but not *Apodemus flavicollis*, acquires resistance to *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), the main European vector of *Borrelia burgdorferi*. Parasite Immunol. 1995. 17:177–183.
7. **Dufour B, and Pouillot R.** Aproche qualitative du risque. Epidemiol. Santé Anim. 2002. 41:35–43.

8. **Estrada-Peña, A.** The relationships between habitat topology, critical scales of connectivity and tick abundance *Ixodes ricinus* in a heterogeneous landscape in northern Spain. *Ecography*. 2003. **26**:661–671.

9. **Estrada-Peña A, Ortega C, Sánchez N, Desimone L, Sudre B, Suk JE, Semenza JC.** Correlation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato prevalence in questing *Ixodes ricinus* ticks with specific abiotic traits in the western palearctic. *Appl Environ Microbiol*. 2011 Jun; **77**(11):3838-45.

10. **Estrada-Peña A, Venzal J. M, Sánchez Acedo C.** The tick *Ixodes ricinus*: distribution and climate preferences in the western Palearctic. *Med. Vet. Entomol*. 2006. **20**:189–197.

11. **European Commission.** Commission Decision of 2 April 2009 amending Decision 2000/96/EC as regards dedicated surveillance for communicable diseases (notified under document number C(2009) 2351) (2009/312/EC). Official Journal of the European Union. Luxembourg: Publications Office of the European Union. 3.4.2009:L 91/27.

12. **European concerted action on Lyme Borreliosis:** Tick, seasonality. [cited 2009 Jan 17]. Available from: <http://www.eucalb.com>.

13. **Gatewood A. G., et al.** Climate and tick seasonality are predictors of *Borrelia burgdorferi* genotype distribution. *Appl. Environ. Microbiol*. 2009. **75**: 2476–2483.

14. **Gern L, Douet V, López Z, Rais O, Morán Cadenas F.** Diversity of *Borrelia* genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in a Lyme borreliosis endemic area in Switzerland identified by using new probes for reverse line blotting. Tick and tick-borne disease. 2010. 1:23-29.

15. **Goodman JL, Dennis DT, Sonenshine DE.** Tick-borne diseases of humans. Washington, DC: ASM Press; 2005.

16. **Gray J.S., et al. 1998.** Lyme borreliosis habitat assessment. Zentralbl. Bakterirol. **287**:211–228.

17. **Gray JS, Dautel H, Estrada-Peña A, Kahl O, Lindgren E.** Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2009; 2009:593232.

18. **Halos L, et al.** Ecological factors characterizing the prevalence of bacterial tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in pastures and woodlands. Applied and Environmental Microbiology. 2010. 76 (13): 4413.

19. **Hanincová K, et al.** 2003. Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe. Parasitology **126**:11–20.

20. **Hanincová K, et al.** 2003. Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia. Appl. Environ. Microbiol. **69**:2825–2830.

21. **Huegli D, Hu C.M, Humair P.F, Wilske B, Gern J.** *Apodemus* species mice are reservoir hosts of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 in Switzerland. J. Clin. Microbiol. 2002. **40**:4735–4737.

22. **Kurtenbach K, Sewell H.S, Ogden N, Randolph S.E, Nuttall P.A.** Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. *Infect. Immun.* 1998. **66**:1248–1251.

23. **Kurtenbach K, Schäfer S.M, De Michelis S, Etti S, Sewell H.S.** 2002. *Borrelia burgdorferi* sensu latu in the vertebrate host, p. 117–148. *In* J. S. Gray, O. Kahl, R. S. Lane, and G. Stanek (ed.), Lyme borreliosis: biology of the infectious agents and epidemiology of disease. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, United Kingdom.

24. **Kurtenbach K, et al. 2006.** Fundamental processes in the evolutionary ecology of Lyme borreliosis. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**:1038–1475.

25. **Lindgren E, and Jaenson T.G.T.** 2006. Lyme borreliosis in Europe: influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures. World Health Organization (WHO) Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark.

26. **Lindgren E, Ebi K.L, Johanneson M.** 2010. Climate change and communicable diseases in the EU Member States. Handbook for national vulnerability, impact and adaptation assessments. ECDC technical document. European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, Sweden.

27. **Margos G, et al.** 2008. MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**:8730–8735.

28. **Peréz D, Kneubuhler Y, Rais O, Jouda F, Gern L.** *Borrelia afzelii* OspC genotype diversity in *Ixodes ricinus* questing ticks and ticks from rodents in two Lyme borreliosis endemic areas: Contribution of co-feeding ticks. *Ticks and tick-borne diseases*. 2011. **2**: 137-142.

29. **Pourel J.** Le diagnostic clinique des manifestations articulaires et musculaires de la borréliose de Lyme. *Médecine et maladies infectieuses*. 2007; **37**: 523–531. France.

30. **Randolph S. E.** 2000. Ticks and tick-borne disease systems in space and from space. *Adv. Parasitol.* **47**:217–243.

31. **Rauter C, Hartung T.** 2005. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a meta-analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:7203–7216.

32. **Remy V.** Place des méthodes biologiques dans le diagnostic des manifestations de la borréliose de Lyme. *Médecine et maladies infectieuses*. 2007; **37**:410–421. France.

33. **Rizzoli A, Hauffe H.C, Carpi G, Vourc'h G.I, Neteler M, Rosà R.** Lyme borreliosis in Europe. *Eurosurveillance*. Jul 2011. **16**: (7).

34. **Steere AC, Coburn J, Glickstein L.** Lyme borreliosis. In: Goodman JL, Dennis DT, Sonenshine DE, editors. *Tick-borne diseases of humans*. Washington, D.C: ASM Press; 2005. p. 176- 188.

