

***Ctenocephalides felis* (Siphonaptera:  
Pulicidae): Morfobiometría y papel  
vectorial.**

ALEJANDRA BAREA CORDONES.





UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE FARMACIA

TRABAJO DE FIN DE GRADO  
GRADO EN FARMACIA

Departamento de Microbiología y Parasitología

*Ctenocephalides felis* (Siphonaptera:  
Pulicidae): Morfobiometría y papel  
vectorial.

**ALEJANDRA BAREA CORDONES**

**FACULTAD DE FARMACIA, SALA DE JUNTAS**

**Tutores:**

**Cristina Cutillas Barrios**

**Antonio Zurita Carrasco**

**-Trabajo de carácter experimental-**



**RESUMEN.**

Las pulgas son ectoparásitos con una representación cosmopolita que con frecuencia parasitan a distintas especies animales, ya sean animales salvajes o animales domésticos que a su vez mantienen un estrecho contacto con los humanos. A nivel de especie, *Ctenocephalides felis* es considerada la especie del Orden Siphonaptera más susceptible de ser encontrada en perros y gatos. Estos insectos pueden ser a su vez infectados por diferentes microorganismos actuando por tanto como un vector potencial de dichos patógenos entre mamíferos. La transmisión de patógenos como pueden ser bacterias del género *Bartonella*, *Wolbachia* o *Rickettsia* a distintos mamíferos, entre otros los humanos, puede provocar patologías como fiebre por arañazo del gato por parte de *Bartonella* sp. o fiebre eruptiva por parte de *Rickettsia* sp. Por otro lado, *Wolbachia* sp. como endosimbionte, podría ejercer un efecto antagónico frente a otros patógenos por lo que puede considerarse un agente potencial para el control de plagas de insectos y vectores de enfermedades anteriormente citadas. Otra peculiaridad del género *Wolbachia* son los procesos de feminización llevados a cabo por las pulgas que son infectadas por dicho endosimbionte, que pueden ser funcionalmente hembras independientemente de su sexo. Todo esto hace que la identificación de *Ctenocephalides felis* en animales domésticos como perros de diferentes zonas geográficas, la comparación desde el punto de vista biométrico de los diferentes individuos aislados, y por último, la detección de patógenos mediante técnicas moleculares, suponga una herramienta clave para el control de plagas desde el punto de vista de la salud pública.

**Palabras clave:** *Ctenocephalides*, *Siphonaptera*, *Bartonella*, *Wolbachia*, *Rickettsia*.



<b><u>ÍNDICE.</u></b>	<b>Página</b>
1. Introducción	2
1.1 Generalidades	2
1.2 Importancia médica	3
1.3 Patógenos transmitidos por <i>Ctenocephalides felis</i>	6
2. Objetivos	11
3. Materiales y métodos	12
3.1 Material	12
3.2 Métodos	13
4. Resultados y discusión	22
4.1 Estudio morfobiométrico	22
4.2 Estudio molecular	27
5. Conclusiones	35
6. Bibliografía	36

## **1. INTRODUCCIÓN.**

### **1.1 Generalidades:**

Las pulgas son insectos pertenecientes al Orden Siphonaptera. Existen 2.500 especies aproximadamente, que se agrupan en 15 familias y 239 géneros (Beaucournu y Gómez, 2015). Su distribución es completamente cosmopolita contando con especies que habitan incluso el Ártico y la Antártida (Lewis, 1998).

Los sifonápteros presentan pequeño tamaño con una longitud aproximada de 1,5 mm a 3,3 mm que puede aumentar hasta los 5 mm. Carecen de alas, son ágiles y poseen un color oscuro incluso negruzco en algunas especies (Cordero, 1999). El cuerpo de los adultos está aplanado dorso-lateralmente y dividido en cabeza, tórax y abdomen, siendo la cabeza una estructura anatómica muy utilizada a la hora de diferenciar algunas especies. Sus piezas bucales son de perforación, se encuentran en una posición ventral y poseen tres estiletos que salen de los palpos labiales, que están divididos en cinco segmentos (Lewis, 1998).

Este aparato bucal de tipo incisivo-chupador, está conformado por estructuras tubulares que permiten su alimentación a base de sangre del hospedador, facilitando la absorción de un volumen de sangre 10 o 20 veces superior al volumen de su propio estómago en un periodo normal de succión entre 20-150 segundos (Cordero, 1999).

Las pulgas cuentan con diferentes adaptaciones al parasitismo, como patas modificadas compuestas por grandes coxas, estando el último par más desarrolladas para lograr grandes saltos, obteniendo así una capacidad de salto de 18 cm en dirección vertical y 33 cm en dirección horizontal imprescindible para colonizar nuevos hospedadores. A su vez, poseen un cuerpo duro que soporta grandes presiones, probablemente como resultado de una adaptación que permite mantenerse intacto ante el rascado del hospedador. Poseen un aspecto pulido y cuentan con pelos y espinas cortas orientadas hacia la parte posterior para mejorar su aerodinámica a la hora de desplazarse de forma fluida entre el pelaje del hospedador (Espaine y col., 1996).

Desde un punto de vista metabólico y de su ciclo biológico, las pulgas son insectos holometábolos o con metamorfosis completa, pasando por diferentes estadios como son: Huevo, larva, pupa y adulto (Lewis, 1998).

Su ciclo biológico en climas templados suele ser anual y en condiciones normales se produce en el hábitat del hospedador. La hembra puede poner cientos de huevos, así, por ejemplo, la pulga del gato puede poner hasta 25 huevos diarios llegando a 700-900 huevos a lo largo de su vida (Lewis, 1998). Tras cinco días, aproximadamente, eclosiona la primera larva,

alimentándose de detritos orgánicos y de la sangre del hospedador como nutriente adicional. A las dos o tres semanas la larva habrá mudado tres veces desarrollándose el capullo de seda que produce sus propias glándulas salivares que dos o tres días más tarde perderá su cutícula transformándose en pupa. Finalmente, tras un par de semanas, la pupa eclosiona al estadio adulto inducida por diferentes estímulos del medio como vibraciones de un posible hospedador.

### 1. 2 Importancia médica:

Algunas especies de pulgas son vectores potenciales de microorganismos presentes en la sangre de sus hospedadores. Entre estas especies se encuentra *Ctenocephalides felis*, cuya distribución es global y se considera la principal especie causante de plagas entre animales domésticos y humanos. La importancia radica en que dicha especie no solo parasita animales domésticos como perros y gatos, sino que a su vez parasita especies de ganado y también animales salvajes, constituyendo, por lo tanto, un puente de transmisión de enfermedades entre distintas especies de animales y el hombre (Dobler y Pfeffer, 2011).

Según los últimos estudios, existen 15 especies de pulgas susceptibles de ser encontradas en perros domésticos. No obstante, para el perro, solo se consideran importantes la pulga del gato (*Ctenocephalides felis*) y la pulga del perro (*Ctenocephalides canis*) (Hendrix, 1999). Además, es importante destacar que en muchos países, más del 90 % de los perros presenta a *C. felis* como especie de sifonáptero habitual, mientras que menos de un 10 % presentan a *C. canis* como especie de sifonáptero habitual (Urquhart y col., 1996).

Las pulgas, como vectores, pueden transmitir protozoos, bacterias (*Rickettsia* sp., *Bartonella* sp., *Wolbachia* sp.) y virus entre mamíferos. Los microorganismos pueden ser transmitidos de hospedador a hospedador mediante contaminación de partes del aparato bucal, saliva, regurgitaciones del aparato digestivo o mediante heces infectadas.

Entre las distintas enfermedades infecciosas transmitidas por pulgas de mayor relevancia a nivel clínico, podemos encontrar:

- La peste.

Se considera la enfermedad más significativa transmitida por pulgas a mamíferos salvajes y humanos. Es causada por *Yersinia pestis*, bacteria cocobacilo Gram negativa comúnmente transmitida a los roedores mediante pulgas, especialmente las pertenecientes a la especie *Xenopsylla cheopis*. Las distintas pandemias de esta enfermedad han supuesto un impacto mayor en la civilización, respecto a muertes ocurridas, que cualquier guerra conocida. Se han descrito tres pandemias hasta la fecha: en primer lugar, la plaga de Justiniano (ocurrida en el

Imperio Romano de Oriente o Imperio Bizantino), en segundo lugar, la peste negra (originada en Asia Central en el siglo XIV y extendida a Europa por las diferentes vías de comercio) y la tercera y última originada en la provincia china de Yunnan. Desde el punto de vista clínico, se conocen tres tipos de peste: peste bubónica, septicémica y neumónica.

La peste más común es la bubónica, que es transmitida mediante picaduras de pulgas infectadas y contacto con cadáveres infectados. Su nombre hace referencia a los bubones, que corresponden a ganglios linfáticos internos muy agrandados normalmente encontrados en la zona axilar e inguinal (Figura 1).



**Figura 1. Bubón en la zona inguinal (Perry y Fetherston, 1997).**

El periodo de incubación es de dos a seis días. Los pacientes infectados tienen una tasa de mortalidad del 50-60 % (Durdin y Traub, 2002). La pulga del perro y el gato, *C. canis* y *C. felis*, respectivamente, se consideran vectores pobres de *Yersinia pestis* (Dobler y Pfeffer, 2011).

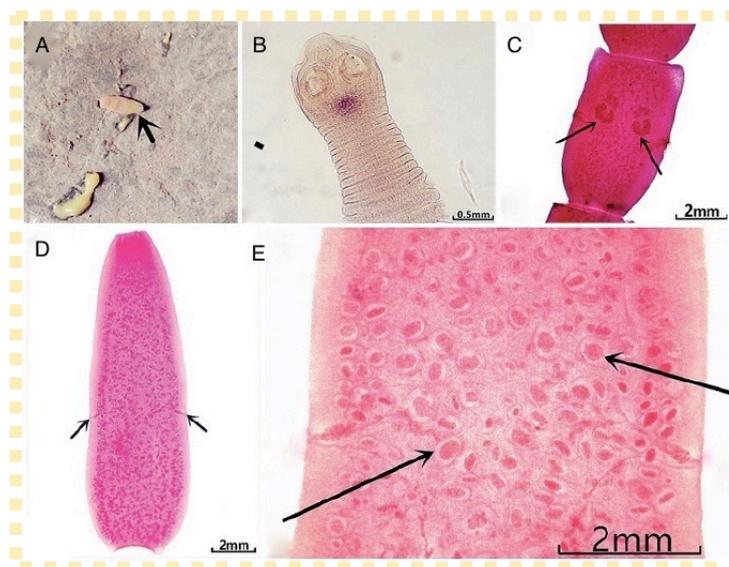
- Micoplasmosis.

La micoplasmosis es una patología producida en perros y en gatos por los patógenos *Mycoplasma haemocanis* y *Mycoplasma haemofelis*, respectivamente. Dichos patógenos son bacterias que carecen de pared celular y son vectorizadas por garrapatas y pulgas, pudiendo infectar a vertebrados como los humanos. Producen alteraciones hemáticas al afectar a los eritrocitos sobre los cuales se produce su adhesión. La sintomatología clínica de esta enfermedad es: depresión, pérdida de apetito y de peso, fiebre e incluso la muerte en casos en los que se produce una coinfección (Compton y col., 2010).

- Dipilidiasis.

Zoonosis producida por *Dipylidium caninum*, también conocida como la tenia del perro. Se trata de un cestodo cuya morfología típica consta de un escólex con cuatro ventosas y un rostelo cónico con varias hileras de ganchos, proglótides maduros más largos que anchos y proglótides grávidos con huevos encapsulados en bolsas (Figura 2). Los proglótides grávidos, salen por el ano del hospedador (comúnmente el perro) liberando así paquetes de huevos en las heces, que pueden ser ingeridos por larvas de pulgas que a su vez sean ectoparásitos de dicho perro. Dentro de la pulga, que actúa como hospedador intermediario (puede ser *C. felis* o *C. canis*), se forma el cisticercoide que al ser ingerido por el hospedador final, puede ser un perro, gato o humano (de forma accidental), da lugar al estadio adulto (el cestodo) en el intestino del hospedador (Peng Jiang y col., 2017).

Los pacientes con dipilidiasis suelen ser asintomáticos y sólo en algunos casos se reconocen síntomas típicos como puede ser pérdida de peso, dolor abdominal u obstrucción intestinal.



**Figura 2. *Dipylidium caninum*. (A) Proglótide expulsado en materia fecal. (B) Escólex. (C) Proglótide maduro con órganos genitales (las flechas indican los dos ovarios) (D) Proglótide grávido con dos poros genitales y numerosos huevos encapsulados en el útero. (E) Ampliación de los poros genitales y los huevos encapsulados (flechas).**

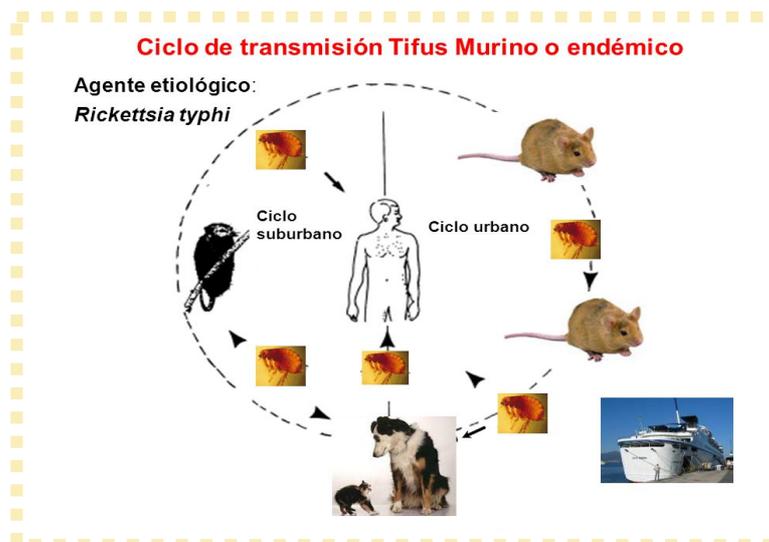
### 1.3 Patógenos transmitidos por *Ctenocephalides felis*:

#### - *Rickettsia* spp.

*Rickettsia* es una bacteria intracelular obligada responsable de un estado clínico febril en humanos. Su transmisión se realiza a través de las heces de pulgas infectadas. Tras la picadura de una pulga infectada, el paciente siente un picor en la zona afectada y mediante el rascado produce un daño en la piel que supone una vía de acceso para el patógeno. A pesar de esto, bajo condiciones experimentales se ha detectado que las pulgas infectadas podrían transmitir la infección mediante simple picadura (Durden y Traub., 2002).

Existen dos especies del género *Rickettsia* de relevancia clínica en humanos y naturalmente transmitidas por pulgas: *Rickettsia typhi* y *Rickettsia felis*. *R. typhi* es el patógeno responsable del tifus murino, también llamado “tifus endémico” o “tifus mejicano”, tratándose de una de las infecciones transmitidas por artrópodos más ampliamente distribuida. Existen zonas con focos de infección de elevada prevalencia como son algunas zonas de Indonesia, China, Tailandia, norte de África y Centroamérica. Su clínica puede ser leve, severa o incluso mortal según el caso. Su gravedad está asociada con la vejez, un diagnóstico tardío o la existencia de patologías subyacentes como insuficiencia renal, anomalía en el SNC, compromiso pulmonar o hepático (Azad y col., 1997).

Se trata de una zoonosis cíclica basada en una transmisión entre pulgas y ratas, siendo los humanos por tanto hospedadores accidentales que pueden verse afectados durante el ciclo (Durden y Traub, 2002) (Figura 3).



**Figura 3. Ciclo de transmisión del tifus murino o endémico.**

Las ratas del género *Rattus* (*R. rattus* y *R. norvegicus*) son las de mayor importancia respecto a la transmisión primaria del ciclo a otros hospedadores vertebrados (Dobler y Pfeffer, 2011). Otros roedores como la rata bandicoot (*Bandicota* spp), ratones domésticos (*Mus musculus*), ratones de campo (*Peromyscus polionotus*), ratas gigantes (*Cricetomys gambianus*) y por último musarañas domésticas (*Suncus murinus*) son hospedadores habituales de *R. typhi* (Durden y Traub, 2002). Los animales domésticos, como los perros, en contacto habitual con los humanos pueden ser infectados por *R. typhi* en diferentes áreas globales. Según citan Dobler y Pfeffer (2011), en España, entre el 10-12 % de los perros presentan anticuerpos frente a dicho patógeno.

Al menos 11 especies de pulgas pertenecientes a 9 géneros diferentes pueden infectarse por *R. typhi*. El vector predominante o más importante es *Xenopsylla cheopis*. Otros vectores son *Xenopsylla astia*, *X. bantorum*, *X. brasiliensis*, *C. felis*, *Pulex irritans*, *Leptosylla segnis* y *Nosopsyllus fasciatus*. La pulga se ve infectada al ingerir el patógeno presente en la sangre del hospedador del que se está alimentando. El patógeno invade, en primer lugar, las células epiteliales del intestino medio y comienza su replicación mediante fisión binaria. Este proceso dura en torno a 7-10 días, lo que supone una invasión a todas las células de manera bastante rápida y finalmente se produce una lisis que libera al patógeno al lumen intestinal siendo finalmente expulsado mediante las heces (Durden y Traub, 2002).

Por otro lado, *R. felis*, considerado el patógeno más extensamente distribuido de todas las especies del género *Rickettsia*, es el causante de la fiebre eruptiva. El vector primario y reservorio de este patógeno es la pulga del gato (*C. felis*) cuya distribución global hace más sencillo el transporte de sus ecto y endoparásitos a distintas zonas geográficas. La presencia de este patógeno también se ha detectado en otras muchas especies de pulgas que actúan a su vez como vectores como son *P. irritans*, *Archaeopsylla erinacei*, *Echidnophaga gallinacea*, *C. canis*, *Tunga penetrans* y *X. cheopis*. Estos vectores se han encontrado parasitando perros domésticos que parecen tener un papel importante en el transporte de dichas especies hasta los humanos. En España, el 16 % de los perros mostraron anticuerpos específicos frente a *R. felis* tal y como muestra un estudio realizado por Dobler y Pfeffer (2011).

- *Bartonella* spp.

*Bartonella* spp. es un bacilo o cocobacilo Gram negativo. Algunas de sus especies como *Bartonella bacilliformis* y *Bartonella clarridgeiae* tienen flagelos, que en el caso de *B. bacilliformis* le facilita la invasión a los eritrocitos.

El género *Bartonella* se compone de 30 especies y subespecies, de las cuales 13 están relacionadas con enfermedades sanguíneas en humanos (Chomel y col., 2009). De todas ellas, algunas pueden ser transmitidas a diferentes hospedadores mediante insectos (flebotomos, piojo, pulga del gato, ácaro del oído y garrapatas) que actúan como vectores. Para ciertos hospedadores, existe una preferencia de vectores que pueden influir más en la transmisión del patógeno, esta preferencia es la responsable de una asociación más frecuente entre algunas especies de *Bartonella* y algunos hospedadores específicos (Tabla 1).

**Tabla 1. Artrópodos asociados con la transmisión de *Bartonella* spp.**

<b>Especies</b>	<b>Vector</b>
<b><i>B. bacilliformis</i></b>	<b>Flebotomos (<i>Lutzomyia</i> sp.)</b>
<b><i>B. quintana</i></b>	<b>Piojo del cuerpo humano (<i>Pediculus humanus</i>)</b>
<b><i>B. henselae</i></b>	<b>Pulga del gato (<i>Ctenocephalides felis</i>)</b>
<b><i>B. vinsonii</i> subsp. <i>vinsonii</i></b>	<b>Ácaros de la piel (<i>Trombicula miroti</i>)</b>
<b><i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i></b>	<b>Garrapatas (especies desconocidas)</b>
<b><i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i></b>	<b>Garrapata del ciervo (<i>Ixodes scapularis</i>)</b>

*Ctenocephalides felis* (la pulga del gato) con frecuencia infesta perros dentro de una misma casa donde existen gatos infectados con *B. henselae* o *B. clarridgeiae* (Valtierra y col., 2016). En España algunos estudios citan valores de un 20 % de hemocultivos positivos que presentan dicho patógeno en mascotas del nordeste de la península. Aunque esta especificidad es el resultado de una asociación del patógeno y el gato como principal reservorio, puede ser que el perro esté también infectado; sin embargo, la concentración de bacterias en sangre, podría ser tan baja que no fuera posible la detección de *B. henselae* en cánidos.

Las heces de pulgas son la principal fuente de infección para *B. henselae* y *B. clarridgeiae* y pueden ser inoculadas por las garras del gato contaminadas, atravesando de forma mecánica la piel mediante zonas escarificadas o por contacto con membranas y conjuntivas (Breitschwerdt y Kordick, 2000). Ambas bacterias provocan una enfermedad denominada “fiebre por arañazo del gato”. El síntoma fundamental de esta enfermedad es una linfadenopatía regional que puede ir acompañada de fatiga y fiebre. Si se produce una

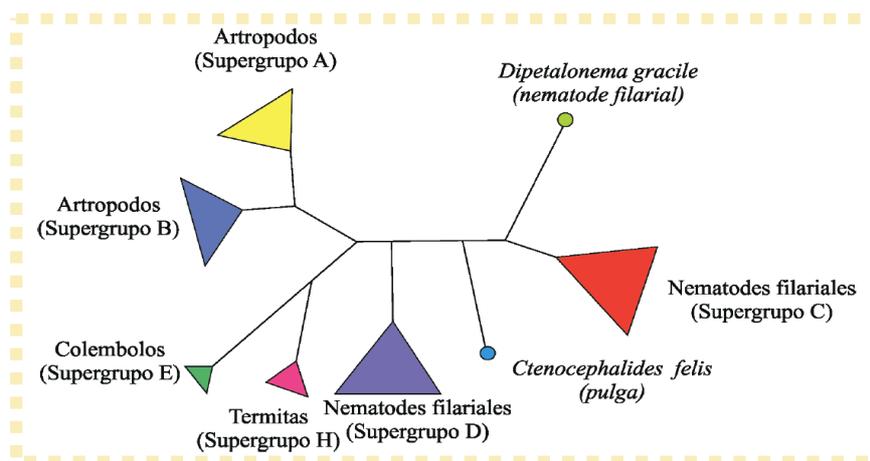
diseminación del patógeno en la sangre puede dar lugar a bacteriemia, neurorretinitis, endocarditis o manifestaciones de tipo neurológico en humanos (Gil y col., 2010).

- *Wolbachia* spp.

El género *Wolbachia* está constituido por bacterias Gram negativas intracelulares obligadas, siendo consideradas como endosimbiontes por su incapacidad de vivir en el ambiente extracelular. Su transmisión es vertical afectando principalmente a nematodos y artrópodos. Dentro de los artrópodos se localizan en sus gónadas pudiendo producir por tanto, alteraciones de tipo genético en los procesos reproductivos de sus hospedadores (Rodríguez, 2013).

*Wolbachia* sp. como endosimbionte bacteriano ha sido encontrado en un 20-75 % de artrópodos, incluido pulgas de la especie *C. felis*. Diferentes estudios identificaron *Wolbachia* sp. en un 21 % de las pulgas obtenidas de dicha especie en Estados Unidos. Por otro lado, este endosimbionte fue identificado en un porcentaje del 17,8 % en un estudio realizado en Francia (Tay, 2013).

La diversidad de *Wolbachia* sp. en el reino animal, se ha puesto de manifiesto en un estudio llevado a cabo en distintas cepas de este género (Werren y col., 2008). El análisis filogenético realizado, permitió realizar la siguiente clasificación: los supergrupos A y B infectan a artrópodos, mientras que los C y D infectan a nematodos (Figura 4). En estudios más recientes se ha añadido el supergrupo "I" el cual está relacionado con la infección de pulgas.



**Figura 4. Árbol filogenético no enraizado de los principales supergrupos del género *Wolbachia* según lo ilustraron Werren y col. (2008).**

La presencia de esta bacteria, permite una alteración en los ciclos de reproducción de los artrópodos infectados. Se dan procesos de incompatibilidad citoplasmática inter e intra-específica, se induce la partenogénesis y se produce androcidio y la feminización de individuos genéticamente machos. El androcidio como tal, es la capacidad de reconocimiento del sexo de los embriones por parte de la bacteria, de esta manera los individuos que son machos mueren incluso antes de la eclosión de los huevos. Esta adaptación se considera una mejora de las hembras ya que da lugar a un crecimiento óptimo de las fases larvarias al aumentar la capacidad de alimentarse de los cadáveres de los machos. Como resultado se obtiene un aumento de su supervivencia y, por tanto, de la transmisión de *Wolbachia* sp. a las siguientes generaciones por parte de las hembras.

Por otro lado, la feminización de los individuos se basa en una alteración en la que las hembras infectadas por *Wolbachia* sp. pueden producir hasta un 90 % de individuos funcionalmente hembras siendo muchas de ellas previamente machos genéticamente. Esta alteración se realiza mediante una interferencia de la bacteria inhibiendo los genes determinantes de la masculinidad, que impiden el desarrollo de la glándula androgénica que a su vez no liberaría la hormona masculina que permite la formación de los testículos.

Por último, la partenogénesis, es un tipo especial de reproducción en el que un huevo no fecundado da lugar a una cría. Este fenómeno permite por tanto el desarrollo de individuos a partir de una progenie compuesta de individuos femeninos, dando lugar por tanto a la capacidad de producción de más hembras infectadas a partir de hembras infectadas (Rodríguez, 2013).

Todo esto puede suponer una ventaja debido a la endosimbiosis ya que no produce patologías en los vertebrados y a su vez puede considerarse un agente potencial para el control de plagas de insectos y vectores de enfermedades (Gonzalez y Martínez, 2015).

## **2. OBJETIVOS DEL TRABAJO.**

El presente Trabajo Fin de Grado tiene dos objetivos fundamentales:

1. Realizar un estudio morfológico de la pulga del perro *Ctenocephalides felis* aislada de perros de distintas zonas geográficas de Andalucía.
2. Valorar el papel vector de *C. felis* mediante la detección de diferentes bacterias patógenas como *Bartonella* sp., *Rickettsia* sp. y *Wolbachia* sp. mediante técnicas de Biología Molecular.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS.

#### 3.1 MATERIAL.

##### Especies parásitas objeto de estudio.

El material objeto de estudio han sido pulgas de la especie *Ctenocephalides felis* recogidas a partir de perros (*Canis lupus familiaris*) procedentes de diferentes zonas geográficas de Cádiz (Sanlúcar de Barrameda) y Sevilla (Fuentes de Andalucía, La Luisiana y Mairena del Aljarafe) (Tabla 2).

Para una correcta identificación se llevó a cabo un estudio morfobiométrico de los individuos aislados que se complementó con la detección en ellos de patógenos mediante estudios moleculares.

##### Recogida del material.

Para la localización y extracción de las pulgas adultas, se realizó una inspección meticulosa de cabeza, cuello, cuerpo, costados, cola y regiones ventrales de cada animal para establecer la ausencia o presencia de pulgas. En cada perro positivo, las pulgas fueron extraídas con pinzas (Figura 5A) y depositadas en un Eppendorf con alcohol de 70º (Figura 5B).

En el laboratorio, los especímenes una vez lavados y desprovistos de restos procedentes del hospedador, fueron depositados individualmente en tubos Eppendorf y almacenados en alcohol de 70º a temperatura ambiente hasta su posterior identificación (Figura 5B).

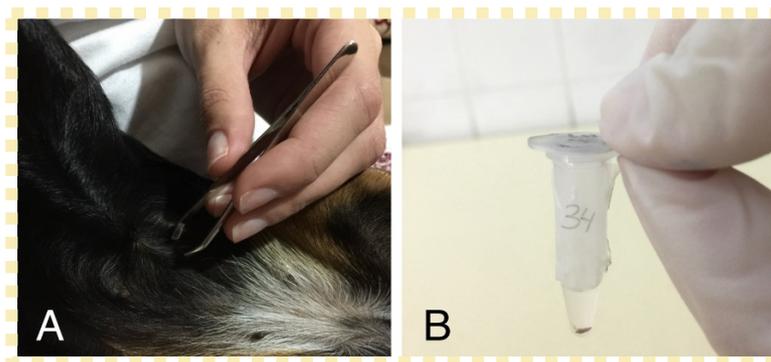


Figura 5. (A) Toma de muestra. (B) Conservación de la muestra.

**Tabla 2. Muestras estudiadas en el presente trabajo clasificadas por hospedador, sexo y origen geográfico.**

<b>Número de muestras</b>	<b>Especie</b>	<b>Hospedador</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Sexo masculino</b>	<b>Sexo femenino</b>
15	<i>C. felis</i>	Mestizo	Sanlúcar de Barrameda (Cádiz)	6	9
15	<i>C. felis</i>	Mestizo	Sanlúcar de Barrameda (Cádiz)	6	9
15	<i>C. felis</i>	Mestizo	Sanlúcar de Barrameda (Cádiz)	4	11
10	<i>C. felis</i>	Mestizo	La Luisiana (Sevilla)	1	9
10	<i>C. felis</i>	Galgo verdino	Fuentes de Andalucía (Sevilla)	0	10
10	<i>C. felis</i>	Galgo blanco	Mairena del Aljarafe (Sevilla)	6	4
<b>TOTAL</b>				<b>TOTAL</b>	<b>TOTAL</b>
<b>75</b>				<b>23</b>	<b>52</b>

### **3. 2. MÉTODOS.**

#### **3. 2. 1. Estudio morfológico.**

Para la identificación morfológica específica de los ejemplares recolectados, se siguió el protocolo descrito por Marrugal y col. (2013), según el cual los ejemplares son transparentados con KOH al 10 % antes de ser montados y observados al microscopio. Una vez

montados los ejemplares, entre porta y cubreobjetos, se observaron bajo microscopio (Nikon Eclipse Ci) y se tuvieron en cuenta para la identificación las descripciones o claves taxonómicas presentes en los siguientes trabajos: Gil Collado (1949); Beaucournu y Launay (1990); Lane y Crosskey (1993); Beaucournu y Ménier (1998); Durden y Traub (2002) y Marrugal y col. (2013).

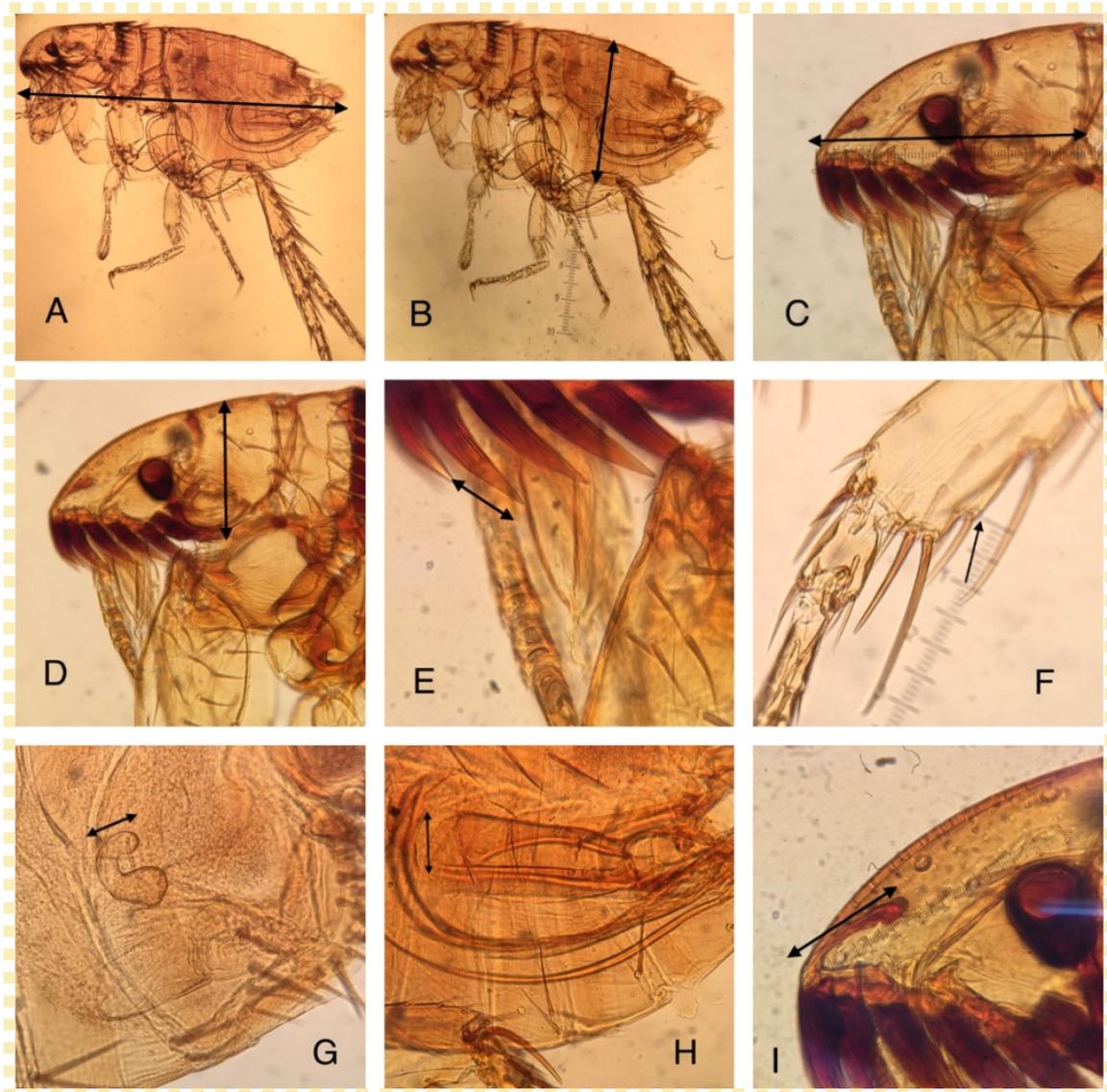
Los caracteres utilizados para la clasificación de las pulgas objeto de estudio han sido los siguientes:

- **Número de muescas o codos en la tibia III.**
- **Diferencia de tamaño entre el primer y segundo diente del ctenidio genal.**
- **Número de espinas presentes en el metepisternito.**
- **Forma de la zona frontal de la cabeza.**
- **El grado de dilatación presente en el ápex del manubrio.**
- **El grado de elongación de la zona apical del hilla de la espermateca.**

### 3. 2. 2. Estudio biométrico.

Los parámetros para realizar el estudio biométrico de las pulgas objeto de estudio han sido los siguientes (Figura 6):

- **Longitud total**, en milímetros (LT).
- **Anchura total**, en milímetros (AT).
- **Relación entre la longitud y la anchura de la cabeza** (LC/AC).
- **Longitud de la cabeza**, en micrómetros (LC).
- **Anchura de la cabeza**, en micrómetros (AC).
- **Diferencia entre la primera y la segunda espina del ctenidio genal**, en micrómetros (DEG).
- **Longitud de la espina adicional (o seta adicional) a la espina situada entre la post-medial y la apical de la tibia III**, en micrómetros (LEAT).
- **Distancia de esta espina adicional a la espina primaria situada entre la post-medial y la apical en la tibia III**, en micrómetros (DET).
- **En los ejemplares hembra, longitud de la zona apical del hilla de la espermateca**, en micrómetros (LH).
- **En los ejemplares macho, anchura del ápex del manubrio**, en micrómetros (AA).
- **Longitud de la incrasación presente en la cabeza**, en micrómetros (LI).



**Figura 6. (A) Longitud total. (B) Anchura total. (C) Longitud de la cabeza. (D) Anchura de la cabeza. (E) Diferencia entre la primera y la segunda espina del ctenidio genal. (F) Tibia III. (G) Longitud de la zona apical de la hilla de la espermateca. (H) Anchura del ápex del manubrio. (I) Longitud de la incrasación de la cabeza.**

### 3. 2. 3. Estudio molecular.

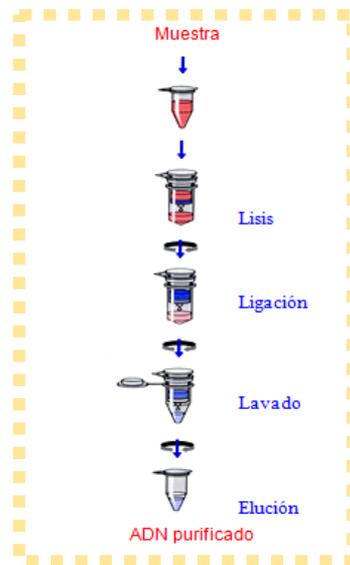
Para la detección molecular de las diferentes especies patógenas objeto de estudio (*Bartonella* sp., *Wolbachia* sp. y *Rickettsia* sp.) se realizaron los siguientes procesos:

1. Extracción total del ADN de la pulga.
2. Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de diferentes marcadores moleculares.
3. Purificación y posterior cuantificación del ADN amplificado.

## 4. Secuenciación.

**3. 2. 3. 1 Extracción del ADN total de la pulga.**

La extracción del ADN genómico de cada adulto se llevó a cabo siguiendo el protocolo de extracción del kit comercial de extracción de ADN, *DNeasy® Blood & Tissue Handbook Kit (QIAGEN)* que extrae un ADN libre de proteínas, nucleasas y de otros contaminantes o inhibidores (Figura 7).



**Figura 7. Esquema del procedimiento de extracción de ADN según el protocolo *DNeasy® Blood & Tissue Handbook* de QIAGEN.**

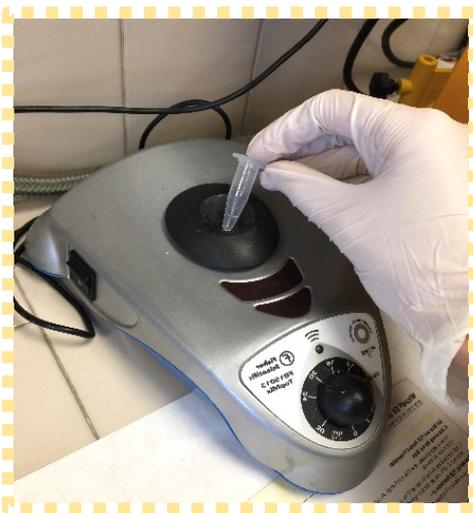
Cada ejemplar seleccionado fue desprovisto del exceso de alcohol, introducido individualmente en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y sometido a nitrógeno líquido (tres ciclos de 5 minutos cada uno). Una vez sacados del nitrógeno líquido introducimos un émbolo en el tubo Eppendorf y apretamos hasta que se produce la rotura de la pulga. Posteriormente, cogimos 180  $\mu$ l de tampón ATL: primero pipeteamos 80  $\mu$ l en cada Eppendorf y machacamos de nuevo con el émbolo y a continuación pipeteamos los 100  $\mu$ l restantes de ATL, intentando limpiar la punta del émbolo de forma que evitemos que se queden restos de la pulga en la punta de éste.

A continuación añadimos 20  $\mu$ l de Proteinasa K a cada Eppendorf, con el fin de realizar la digestión de los tejidos. A cada Eppendorf se le aplicará un vórtex vigoroso y posteriormente los incubaremos durante tres horas a 56° C (Figura 8). Durante esas tres horas, cada media hora sacamos los Eppendorf para aplicarles un vórtex vigoroso (Figura 9) de tal forma que se lisen los tejidos.

Una vez finalizado este tiempo, añadimos 4  $\mu$ l de ARNasa a cada Eppendorf. Después se saca y se le da un vórtex durante 15 segundos. Añadimos 200  $\mu$ l de tampón AL y damos de nuevo un vórtex vigoroso. Posteriormente añadimos 200  $\mu$ l de etanol puro y damos un vórtex (Figura 9).



**Figura 8. Tubo Eppendorf en placa calefactora.**



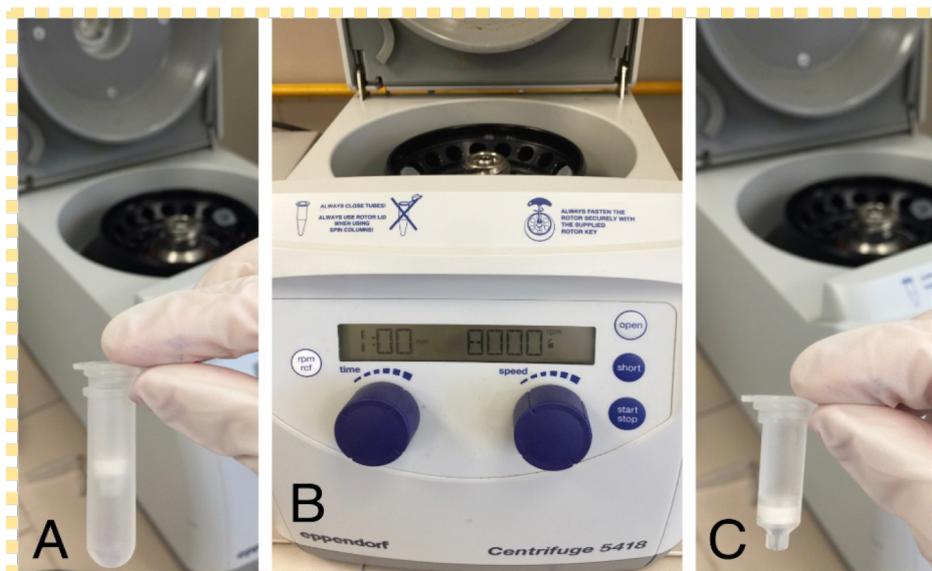
**Figura 9. Procedimiento de Vórtex.**

Se traspasa el contenido del Eppendorf a una columna. Las columnas se centrifugan a 8000 r.p.m durante 1 minuto. Tras lo cual tiramos la parte inferior de la columna y la parte superior se introduce en una nueva.

Añadimos 500  $\mu$ l de tampón AW1 y centrifugamos 800 r.p.m durante 1 minuto. Desechamos de nuevo la parte inferior y la superior la ponemos en una nueva. Añadimos 500  $\mu$ l de tampón AW2 y centrifugamos a 1400 r.p.m durante 3 minutos.

Posteriormente, desechamos el sobrenadante pero dejamos el mismo tubo y centrifugamos a 1400 r.p.m. durante 1 minuto, tras lo cual desechamos la parte inferior y la columna se introduce en un Eppendorf de 1'5 ml.

Añadimos 100  $\mu$ l de tampón AE y dejamos 1 minuto a temperatura ambiente, centrifugamos a 8000 r.p.m. durante 1 minuto. Finalmente, ya tenemos en la columna el ADN de la pulga concentrado (Figura 10).



**Figura 10. Proceso de centrifugado y concentración del ADN extraído. A) Columna junto con tubo colector. (B) Centrifuga. (C) Columna con ADN concentrado extraído.**

Una vez extraído el ADN, se lleva a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % en tampón TBE (Tris- Borato- EDTA) 0,5X. La presencia del ADN se revela mediante la adición de “Sybr safe” al gel (Promega), que se intercala en la doble cadena del ADN y permite su visualización debido a la excitación tras la exposición del gel a la luz ultravioleta de un transiluminador entre 302-312 nm (Sambrook y Russell, 2001).

Para la formación del gel añadimos 0,8 g de agarosa y 40 ml de tampón TBE, lo metemos en el microondas hasta que dejen de formarse burbujas. Posteriormente, añadimos 1  $\mu$ l de Sybr safe y vertemos la mezcla en la cubeta de electroforesis (Figura 11).

### **3. 2.3. 2. Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en una reacción enzimática que permite la amplificación de fragmentos de ADN de longitud entre 100 y varios miles de pares de bases mediante ciclos repetitivos de tres reacciones simples (desnaturalización, hibridación y elongación), llevadas a cabo a distintas temperaturas de incubación. Por lo tanto, toda la reacción se produce en el mismo medio y el proceso está totalmente automatizado (Mullis y Faloona, 1987; Saiki y cols., 1988).

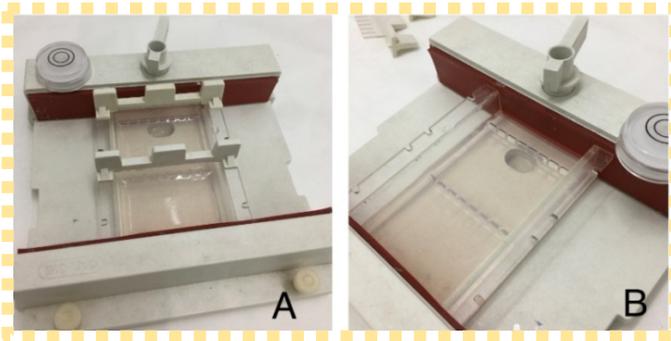


Figura 11. Preparación de gel de agarosa en una cubeta de electroforesis. (A) Gel de agarosa con peines. (B) Pocillos en el gel de agarosa.

Para realizar la técnica de PCR se utilizó el termociclador “Master®cyclor ep gradient”. La puesta a punto de la técnica se llevó a cabo con distintas concentraciones de los reactivos, hasta llegar a las condiciones óptimas de reacción (Tabla 3).

Tabla 3. Condiciones óptimas de los reactivos de PCR.

REACTIVOS	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
Cebador directo (10 μM)	5 μl	1 μM
Cebador reverso (10 μM)	5 μl	1 μM
ADN diana	5 μl	-----
GoTaq G2 Green Mater Mix (Promega)	25 μl	-
H <sub>2</sub> O bidestilada c.s.p.	Hasta 50 μl	-----

Las condiciones utilizadas para la detección molecular de *Bartonella* sp. y *Wolbachia* sp. han sido las de Rolain y col. (2003) (Figura 12).

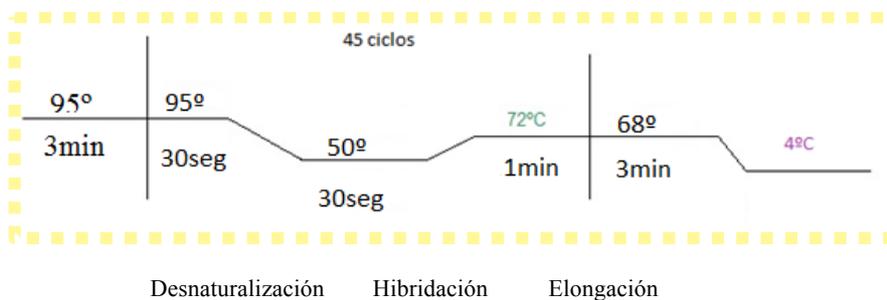
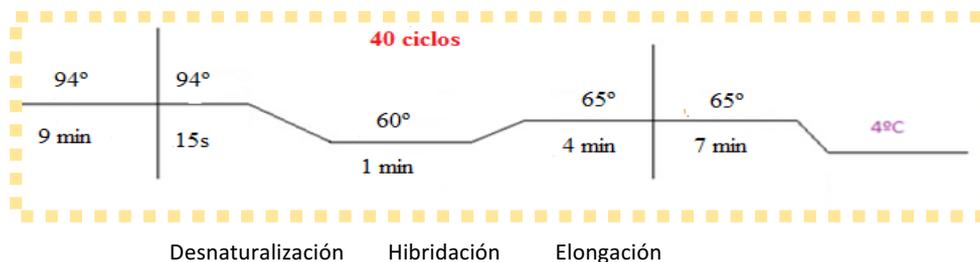


Figura 12. Representación esquemática de las condiciones de la PCR para la detección de *Bartonella* sp. y *Wolbachia* sp.

Las condiciones utilizadas para la detección molecular de *Rickettsia* sp. han sido las de Jado y col. (2006) (Figura 13).



**Figura 13. Representación esquemática de las condiciones de PCR para la detección de *Rickettsia* sp.**

**Tabla 4. Primers utilizados para la detección de patógenos en el presente trabajo.**

Microorganismos	Secuencias	Primers D= Directo. R= Reverso.	Referencias
<i>Wolbachia</i> sp.	Gen 16S del ADN ribosómico	D= 5' GGTACCYACAGAAGAAGT CC3' R= 5' TAGCACTCATCGTTTACAGC 3'	Rolain y col. (2003).
<i>Bartonella</i> sp.	ITS localizado entre los genes 16S y 23S	D= 5' CTTCGTTTCTCTTCTTCA 3' R= 5' CTTCTCTTAACAATTTCAAT 3'	Rolain y col. (2003).
<i>Rickettsia</i> sp.	ITS localizado entre los genes 23S y 5S	D= 5' GATAGGTCRGTGTGGAAGCAC 3' R= 5' TCGGGAYGGGATCGTGTGTTTC 3'	Jado y col. (2006).

En cada proceso de amplificación se incluye un control positivo y un control negativo. El patrón de pesos moleculares que se utilizó fue el DNA Molecular Weight Marker IX (72-1353 bp) que nos permite calcular los tamaños de los fragmentos obtenidos. Una vez finalizada la reacción de PCR, los productos obtenidos son visualizados en un gel de agarosa con tampón TBE a una concentración del 2 %. Para ello, cargamos 5 µl de producto de PCR. Por último, el gel obtenido se fotografía (para visualizar los fragmentos de ADN amplificados), sobre un transiluminador de luz ultravioleta a una longitud de onda de 360 nm, con una cámara digital Kodak (Gel Logic 100 Imagin System) asociada al programa Kodak 1D 2.6.

#### Reactivos de electroforesis:

##### Tampón TBE 5X:

1. Tris (54 g).
2. Ácido bórico (27,5 g).

##### Sybr safe:

1. 4 µl.
2. Conservación a temperatura ambiente.

3. EDTA (3,72 g).
4. Agua destilada, c.s.p. 1000 ml.

### **3. 2. 3. 3. Purificación y posterior cuantificación del ADN.**

La purificación del producto de PCR se realizó utilizando el Kit de Promega, QWizard®SV Gel and PCR Clean-Up System, que nos permitió extraer y purificar el ADN a partir del gel de agarosa y del producto de PCR directamente. Una vez purificado, y para realizar una determinación aproximada de la concentración, se compara la intensidad de la banda del ADN purificado con la de un marcador de pesos moleculares de tamaño y concentración conocida.

### **3. 2. 3. 4. Secuenciación.**

Los fragmentos de ADN amplificados en este trabajo han sido secuenciados por la Empresa Stab Vida (Portugal) mediante un secuenciador automático (Licor).

#### **Análisis de las secuencias.**

Para la identificación de las secuencias obtenidas utilizamos el programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul y col., 1990) que compara todas las secuencias existentes en distintas bases de datos mediante un porcentaje de credibilidad.

El alineamiento y los análisis de las secuencias se llevaron a cabo utilizando el programa Clustal X versión 2.0 (Larkin y col., 2007) y MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 5.0 (Tamura y col., 2011).

Estas aplicaciones permitieron la comparación de las secuencias obtenidas con secuencias extraídas de bases de datos de ADN (GenBank), para confirmar la presencia de *Wolbachia* sp., *Bartonella* sp. y *Rickettsia* sp.

#### **Análisis filogenético.**

A partir de los alineamientos de las diferentes matrices de datos se seleccionaron los modelos evolutivos más adecuados al paquete de secuencias mediante el programa *jModeltest* versión 0.1.1. (Posada, 2008). A partir de estos modelos se reconstruyeron los árboles filogenéticos. El método de reconstrucción filogenético utilizado fue el método de máxima verosimilitud (*ML*, *Maximum Likelihood*).

Como métodos para la obtención de los soportes estadísticos de los árboles filogenéticos se realizó un muestreo repetitivo entre 100 y 1000 réplicas (*bootstrap*). El *bootstrap test* (Felsenstein, 1985) es una técnica utilizada para evaluar la fiabilidad de un árbol filogenético.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

##### 4. 1. ESTUDIO MORFOBIOMÉTRICO.

En este trabajo se han estudiado 75 pulgas de la especie *Ctenocephalides felis*, de las cuales 30 procedían de distintas localidades de Sevilla (La Luisiana, Fuentes de Andalucía y Mairena del Aljarafe) y 45 de Sanlúcar de Barrameda (Cádiz).

En el presente trabajo, se encontró una diferencia importante entre el número de individuos hembras y machos, siendo el primer grupo mucho más numeroso, e incluso responsable de que en algunas poblaciones como Fuentes de Andalucía no se cuente con ningún macho, y en el muestreo de La Luisiana solo se cuente con un ejemplar. Esto es debido a que las pulgas son ectoparásitos temporales y, a su vez, los machos poseen un periodo de vida más corto y activo, lo que implica una menor permanencia sobre su hospedador (Marshall, 1981).

Para la identificación morfológica a nivel de especie se utilizaron los caracteres citados en el apartado de materiales y métodos, observándose los siguientes resultados:

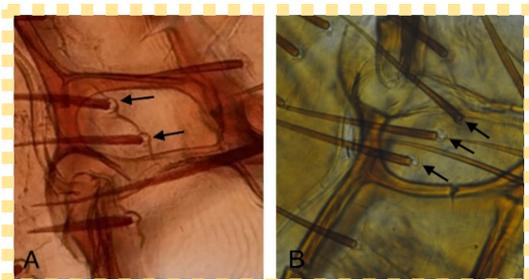
- **Diferencia de tamaño entre el primer y segundo diente del ctenidio genal.**



La primera espina del ctenidio genal se observó igual o un poco más corta que la segunda (Figura 14). A diferencia de la especie *C. canis* donde esta primera espina se presenta significativamente más corta que la segunda.

**Figura 14. La flecha indica la primera espina del ctenidio genal.**

- **Número de espinas presentes en el metepisternito.**



Se observó la presencia de tres espinas en el metepisternito (Figura 15B), aunque algunos ejemplares mostraron la presencia de dos espinas (Figura 15A).

**Figura 15. (A) Ejemplares con dos espinas en el metepisternito. (B) Individuos con tres espinas en el metepisternito.**

- **Forma de la zona frontal de la cabeza.**

Los individuos hembras mostraron la cabeza aproximadamente dos veces más larga que ancha (Figura 16A), mientras que esta relación era menor en el caso de los machos (Figura 16B).

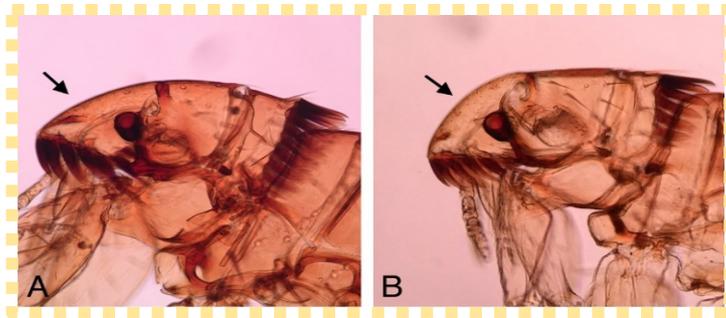


Figura 16. (A) Cabeza de *C. felis* hembra. (B) Cabeza de *C. felis* macho.

- **Número variable de espinas entre la espina apical y la post-medial de la tibia III.**

Se observó en la tibia III una espina simple, corta y fuerte acompañada de una pequeña seta, a veces ausente, muy cercana a la misma (Figura 17).



Figura 17. Espina simple acompañada de una seta en la tibia III de *C. felis*.

- **Grado de dilatación presente en el ápex del manubrio.**

El ápex del manubrio de *C. felis* no presentó dilatación (Figura 18).

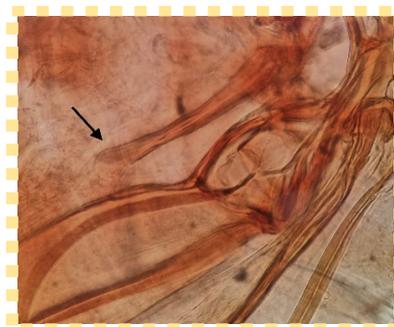


Figura 18. Ápex del manubrio del macho de *C. felis*.

- **Grado de elongación en la zona apical del hilla de la espermateca.**

La espermateca presentó forma arriñonada, sin elongación en la zona apical del hilla (Figura 19).



**Figura 19. Parte posterior de la hembra de *C. felis*. La flecha indica la parte apical del hilla.**

Los caracteres morfológicos basados en: Diferencia de tamaño entre el primer y segundo diente del ctenidio genal, forma de la zona frontal de la cabeza, grado de dilatación presente en el ápex del manubrio y grado de elongación de la zona apical del hilla de la espermateca, confirmaron su utilidad taxonómica tanto para la identificación morfológica de la especie *C. felis* como para la diferenciación de ésta con la especie congénica *C. canis*. Sin embargo, el número de espinas presentes en el metepisternito y el número de muescas o codos en la tibia III no mostraron utilidad taxonómica para discriminar entre ambas especies congénicas. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Linardi y Santos (2012), Marrugal y col. (2013) y Zurita y col. (2016). No se observaron diferencias morfológicas significativas para la especie *C. felis* entre las distintas zonas geográficas estudiadas

Los valores del estudio biométrico se han distribuido en dos tablas diferenciando los individuos machos (Tabla 5) y hembras (Tabla 6) ya que el sexo es un factor importante a la hora de diferenciar poblaciones.

A la vista de los valores biométricos obtenidos puede observarse una clara diferencia entre la longitud total y la anchura total de machos y hembras, siendo estas últimas más largas y anchas que los machos, oscilando la longitud de los machos entre 1,47 mm- 2,23 mm y de las hembras entre 1,87 mm- 2,96 mm. No hubo diferencias significativas entre las pulgas aisladas de distintas zonas geográficas.

**Tabla 5. Resultados biométricos obtenidos en los machos de *C. felis* procedentes de distintas zonas geográficas.**

	La Luisiana				Mairena del Aljarafe				Sanlúcar de Barrameda (1A)				Sanlúcar de Barrameda (2A)				Sanlúcar de Barrameda (2B)							
	MIN	MAX	MEDIA	DESV.T	MIN	MAX	MEDIA	DESV.T	MIN	MAX	MEDIA	DESV.T	MIN	MAX	MEDIA	DESV.T	MIN	MAX	MEDIA	DESV.T	MIN	MAX	MEDIA	DESV.T
<b>LT (mm)</b>	1,72	1,79	1,92	0,08	1,79	1,98	1,92	0,08	1,47	1,98	1,75	0,22	1,61	2,23	1,86	0,21	1,55	2,05	1,79	0,25	1,47	1,98	1,75	0,22
<b>AT (mm)</b>	0,88	0,81	0,88	0,03	0,81	0,88	0,84	0,03	0,65	0,78	0,72	0,05	0,68	0,87	0,78	0,07	0,67	0,84	0,73	0,09	0,65	0,78	0,72	0,05
<b>LC/AC (µm)</b>	19,82	16,74	18,10	1,03	16,74	19,53	18,10	1,03	16,59	20,31	18,27	1,46	16,25	20,00	18,07	1,33	16,25	19,43	17,70	1,61	16,59	20,31	18,27	1,46
<b>LC (µm)</b>	404,34	404,34	451,22	37,61	404,34	498,10	451,22	37,61	351,60	451,22	398,01	35,80	363,32	451,22	412,15	41,21	380,90	398,48	392,62	10,15	351,60	451,22	398,01	35,80
<b>AC (µm)</b>	222,68	234,40	247,10	11,37	234,40	263,70	247,10	11,37	181,66	240,26	219,75	22,47	205,10	263,70	228,54	22,54	205,10	234,40	222,68	15,50	181,66	240,26	219,75	22,47
<b>DEG (µm)</b>	29,30	35,16	42,00	6,85	35,16	52,74	42,00	6,85	29,30	46,88	37,11	6,05	35,16	58,60	45,90	8,63	17,58	46,88	31,25	14,75	29,30	46,88	37,11	6,05
<b>LEAT (µm)</b>	87,90	64,46	73,25	8,08	64,46	82,04	73,25	8,08	52,74	82,04	65,44	11,96	52,74	87,90	69,34	11,96	64,46	70,32	68,37	3,38	52,74	82,04	65,44	11,96
<b>DET (µm)</b>	47,00	39,95	47,78	7,23	39,95	58,75	47,78	7,23	35,25	61,10	45,04	9,79	35,25	58,75	49,74	8,06	42,30	49,35	46,22	3,59	35,25	61,10	45,04	9,79
<b>AA (µm)</b>	35,20	12,00	21,58	7,58	12,00	32,90	21,58	7,58	16,40	32,90	23,49	6,14	28,20	37,60	33,68	3,54	21,15	28,20	24,28	3,59	16,40	32,90	23,49	6,14
<b>LI (µm)</b>	70,32	58,60	66,41	7,10	58,60	76,18	66,41	7,10	58,60	99,62	72,27	14,67	64,46	87,90	69,34	9,39	64,46	76,18	68,37	6,77	58,60	99,62	72,27	14,67

Tabla 6. Resultados biométricos obtenidos en las hembras de *C. felis* procedentes de distintas zonas geográficas.

	La Luisiana				Fuentes de Andalucía				Mairena del Aljarafe			
	MIN	MAX	MEDIA	DESV.T	MIN	MAX	MEDIA	DESV.T	MIN	MAX	MEDIA	DESV.T
<b>LT (mm)</b>	2,08	2,51	2,29	0,13	2,40	2,96	2,60	0,17	2,54	2,89	2,67	0,16
<b>AT (mm)</b>	1,05	1,25	1,05	0,36	1,11	1,34	1,24	0,07	1,11	1,19	1,14	0,03
<b>LC/AC (µm)</b>	15,58	20,48	17,82	1,36	16,66	18,70	17,71	0,70	16,74	17,83	17,21	0,50
<b>LC (µm)</b>	429,20	503,96	465,70	26,30	439,50	503,06	465,78	22,82	445,36	509,82	471,73	29,69
<b>AC (µm)</b>	246,12	275,42	261,75	9,72	246,12	275,42	263,11	11,20	263,70	293,00	273,96	12,99
<b>DEG (µm)</b>	23,44	41,02	32,56	5,94	35,16	70,32	50,98	9,18	35,16	58,60	43,95	10,15
<b>LEAT (µm)</b>	70,32	99,62	89,85	9,27	76,18	99,62	85,56	8,82	64,46	105,48	82,04	17,25
<b>DET (µm)</b>	42,30	63,45	54,31	7,29	44,65	65,80	54,29	7,05	42,30	63,45	53,46	9,47
<b>LH (µm)</b>	30,55	37,60	34,04	2,96	28,20	35,25	32,20	2,23	28,20	37,60	33,49	4,01
<b>LI (µm)</b>	82,04	105,48	93,76	6,55	82,04	117,20	96,10	11,46	87,90	123,06	96,69	17,58

	Sanlúcar de Barrameda (1A)				Sanlúcar de Barrameda (2A)				Sanlúcar de Barrameda (2B)			
	MIN	MAX	MEDIA	DESV.T	MIN	MAX	MEDIA	DESV.T	MIN	MAX	MEDIA	DESV.T
<b>LT (mm)</b>	1,87	2,66	2,42	0,25	2,36	2,83	2,54	0,15	2,13	2,69	2,45	0,19
<b>AT (mm)</b>	0,91	1,20	1,09	0,09	1,03	1,22	1,11	0,07	0,97	1,20	1,10	0,08
<b>LC/AC (µm)</b>	16,20	21,50	17,70	1,90	16,22	480,52	75,48	163,66	16,10	20,50	17,70	1,20
<b>LC (µm)</b>	421,90	468,80	437,70	16,20	263,70	480,52	425,18	66,31	375,00	486,40	441,50	35,80
<b>AC (µm)</b>	199,30	275,42	494,50	734,40	182,22	275,42	246,18	27,48	205,10	263,70	249,50	19,10
<b>DEG (µm)</b>	35,16	58,60	45,58	8,68	29,30	64,46	41,02	10,56	5,90	58,60	38,60	13,80
<b>LEAT (µm)</b>	76,20	93,80	85,30	6,60	70,32	111,34	87,29	12,63	52,70	99,60	82,00	13,70
<b>DET (µm)</b>	42,30	61,10	55,10	5,40	47,00	58,75	53,53	4,03	30,60	56,40	49,20	7,70
<b>LH (µm)</b>	25,90	35,30	30,30	2,50	23,50	35,25	30,03	3,86	23,50	35,50	29,40	4,30
<b>LI (µm)</b>	87,90	117,20	99,00	9,00	70,32	117,20	97,67	16,05	76,20	128,90	101,90	15,90

#### **4. 2. ESTUDIO MOLECULAR.**

En este trabajo se ha realizado una detección molecular de patógenos pertenecientes a tres géneros diferentes: *Wolbachia*, *Bartonella* y *Rickettsia* (Tabla 7) (Figura 20). El estudio se llevó a cabo en 40 pulgas, de las cuales 30 pertenecen a diferentes zonas geográficas de Sevilla (La Luisiana, Fuentes de Andalucía y Mairena del Aljarafe) y 10 pertenecían a Cádiz (Sanlúcar de Barrameda).

**Tabla 7. Presencia/ ausencia de las bacterias patógenas analizadas en el presente estudio en distintas poblaciones de *C. felis* aisladas de perros de distintas zonas geográficas.**

				<i>Wolbachia</i>	<i>Bartonella</i>	<i>Rickettsia</i>
617 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	La Luisiana	-	-	+
618 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	La Luisiana	+	-	-
619 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	La Luisiana	+	-	-
620 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	La Luisiana	-	-	-
634 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	La Luisiana	+	-	-
635 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	La Luisiana	-	-	-
636 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	La Luisiana	+	-	-
637 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	La Luisiana	+	-	-
621 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	La Luisiana	-	-	+
641 ♂	<i>C. felis</i>	Perro	La Luisiana	-	-	-
642 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	F. de Andalucía	+	-	-
643 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	F. de Andalucía	+	-	-
644 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	F. de Andalucía	+	-	-
645 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	F. de Andalucía	+	-	-
647 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	F. de Andalucía	+	-	-
651 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	F. de Andalucía	+	-	-
657 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	F. de Andalucía	+	-	-
659 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	F. de Andalucía	+	-	-
661 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	F. de Andalucía	+	-	-
663 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	F. de Andalucía	+	-	-
217 ♂	<i>C. felis</i>	Perro	Mairena del Aljarafe	-	-	-
218 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	Mairena del Aljarafe	-	-	-
219 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	Mairena del Aljarafe	+	-	-
220 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	Mairena del Aljarafe	+	-	-
221 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	Mairena del Aljarafe	+	-	-
222 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	Mairena del Aljarafe	+	-	-
223 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	Mairena del Aljarafe	+	-	-
225 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	Mairena del Aljarafe	+	-	-
228 ♂	<i>C. felis</i>	Perro	Mairena del Aljarafe	-	-	-
233 ♂	<i>C. felis</i>	Perro	Mairena del Aljarafe	-	-	-
800 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	Sanlúcar de Barrameda	+	-	-
802 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	Sanlúcar de Barrameda	+	-	-
815 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	Sanlúcar de Barrameda	+	-	-
816 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	Sanlúcar de Barrameda	+	-	-
817 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	Sanlúcar de Barrameda	+	-	-
825 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	Sanlúcar de Barrameda	+	-	-
829 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	Sanlúcar de Barrameda	+	-	-
832 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	Sanlúcar de Barrameda	+	-	-
836 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	Sanlúcar de Barrameda	+	-	-
841 ♀	<i>C. felis</i>	Perro	Sanlúcar de Barrameda	+	-	-

La representación gráfica de los resultados obtenidos según el origen geográfico del hospedador sería:

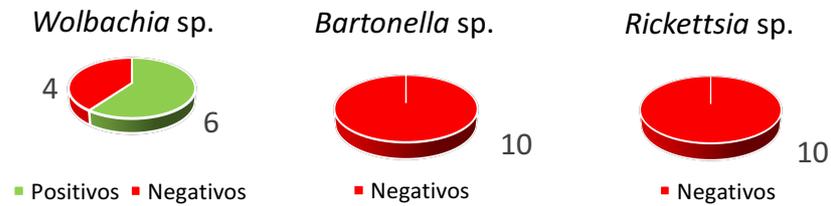
La Luisiana.



Fuentes de Andalucía.



Mairena del Aljarafe.



Sanlúcar de Barrameda.



**Figura 20. Representación gráfica de la prevalencia observada para cada bacteria patógena estudiada en las distintas poblaciones de *C. felis*.**

***Bartonella* sp.**

Los resultados obtenidos en la detección de patógenos referentes al género *Bartonella* fueron todos negativos en las muestras tomadas procedentes de distintas zonas geográficas. Nuestros resultados difieren de otros donde sí se observó la presencia del género *Bartonella* en *C. felis* de Andalucía (Márquez y col., 2004). Dicho resultado puede ser debido a la presencia de *Wolbachia* sp. en estos individuos. Se ha sugerido que la presencia de *Wolbachia* sp. como endosimbionte en el Orden Siphonaptera podría ejercer un efecto antagónico al establecimiento de otras especies patógenas, siendo ésta la razón por la que la mayoría de muestras estudiadas revelan la presencia de *Wolbachia* sp. y por el contrario resultan negativas respecto a la presencia de *Bartonella* sp. (Zurita y col., 2016). Así, la presencia de ésta según estudios como el de Segoli y col. (2014) y Slatko y col. (2014) puede suponer una diana a la hora de luchar contra la transmisión de ciertos patógenos por artrópodos vectores.

***Wolbachia* sp.**

Por otro lado, *Wolbachia* sp. estaba presente en todas las zonas geográficas estudiadas, resultando positivas en el 100 % de las muestras de Fuentes de Andalucía y Sanlúcar de Barrameda.

Posteriormente, se secuenciaron las muestras que resultaban ser positivas respecto a los patógenos estudiados de cada zona geográfica. Las secuencias pertenecientes a *Wolbachia* sp. fueron 100 % idénticas entre ellas, sin observarse diferencias nucleotídicas. Al incorporarlas en el programa BLAST, fueron identificadas como *Wolbachia pipientis* con un número de acceso ya registrado (Figura 21). Y las secuencias obtenidas fueron comparadas con otras secuencias de GenBank, obteniéndose un árbol filogenético correspondiente a *Wolbachia* sp. basándonos en el gen parcial 16S del ARN ribosómico (Figura 22). Este árbol mostró que nuestras secuencias estaban estrechamente relacionadas con *W. pipientis*.

**Secuencia del patógeno detectado, *Wolbachia pipientis*: (Número de acceso: LN864488).**

```
AGAAGTCCTGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGAGGGCTAGCGTTATTCGGAATCATTGG
GCGTAAAGGGCGCGTAGGCTGATTAGTAAGTTAAAAGTGAAATCCAAGGCTCAACCTTGAATTGCTTTTAA
AACTGCTAATCTAGAGATTGAAAGAGGATAGAGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAAATATTAGGA
GGAACACCAGTGCGAAGGCGTCTATCTGGTTCAAATCTGACGCTGAGGCGGAAGGCGTGGGGAGCAAAC
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATAAGTGCTAA (334 pb).
```

**Figura 21. Secuencia de *Wolbachia pipientis* obtenida en el presente estudio.**

Estos resultados confirman la presencia de esta bacteria como endosimbionte común en el Orden Siphonaptera al igual que lo hacen otros estudios anteriores como los de Heukelbach y col. (2004), Oteo y col. (2014) y Zurita y col. (2016). En particular, hemos detectado la presencia de la especie *Wolbachia pipientis* como endosimbionte tras la secuenciación de las muestras positivas coincidiendo con estudios como el de Lo y col. (2007) que menciona a dicha especie como endosimbionte único para el género *Wolbachia*.

Otro aspecto interesante respecto a la presencia del género *Wolbachia*, es que su porcentaje de prevalencia es muy amplio oscilando desde un 50 % hasta un 100 % en nuestro estudio. Dicho resultado coincide con estudios llevados a cabo por Gorham y col. (2003) y Heukelbach y col. (2004), cuya prevalencia estudiada respecto al género *Wolbachia* oscilaba entre el 7 % y el 100 %. Este rango tan amplio es debido a las limitaciones existentes respecto al número de individuos muestreados como a las distintas zonas geográficas seleccionadas para el estudio.

Por otro lado, todos los individuos macho han obtenido un resultado negativo respecto a la presencia endosimbiótica de *Wolbachia* sp. Este hecho ya fue observado por Zurita y col. (2016) y puede ser explicado por el proceso de feminización que sufren los individuos infectados por este patógeno, los cuales pasan a ser hembras funcionales mediante un proceso de partenogénesis al ser infectados por *Wolbachia pipientis*. Además, las hembras que son infectadas por este patógeno tendrán una descendencia femenina con un 90 % de probabilidad, aumentando por tanto el número de hembras en las generaciones posteriores, tal y como demuestra Cordaux y col. (2011) en su estudio. Por lo tanto, el sexo de los especímenes estudiados sí parece influir en la prevalencia obtenida para este endosimbionte, no así la raza de los perros o su origen geográfico.

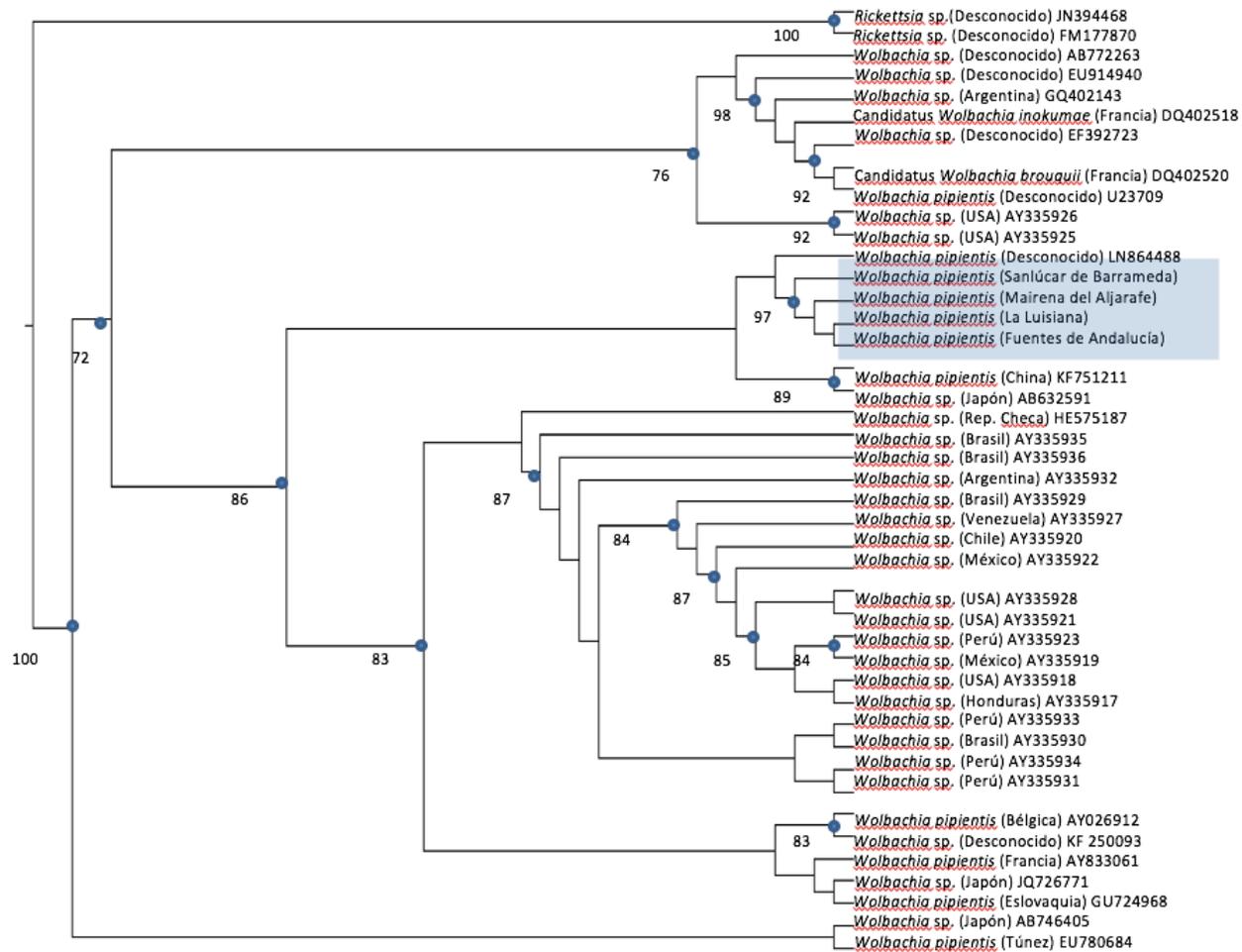


Figura 22. Árbol filogenético de *Wolbachia* sp. de diferentes zonas geográficas basadas en el gen parcial del ARN ribosómico 16S. Valores de bootstrap < 70 no mostrados.

***Rickettsia* sp.**

La presencia de *Rickettsia* sp. sólo se detectó en dos muestras de La Luisiana (número 617 y 621). Una vez secuenciadas, fueron idénticas y correspondían a la especie *Rickettsia felis* (Figura 23). Finalmente, las muestras que resultaron ser positivas y fueron secuenciadas pertenecientes a La Luisiana, fueron comparadas con otras secuencias de GenBank, obteniéndose un árbol filogenético correspondiente a *Rickettsia* sp. basado en el espaciador interno presente entre los genes 23S- 5S (Figura 24).

**Secuencia de *Rickettsia felis*: (Número de acceso: LT898468).**

```
GTGGAAGCACAGTAATGTGTGTAGCTAACTGATACTAATAGCTCGATTGATTTACTTTGCTGTGAGATTACATA
TGCATATAGTGTTAATTCTATAAAAATGTAGTATCAACTCACAAAGTTATCAGGTTAAATTAGCTTTACCAATG
AATAAAAATGTTGTTGCACAGCTAATAATGTTATACCGTGGTCCCGCCACGGTATCTAGAAAAATTTTAAATAT
TTAGATTCTTGCTTCCGCAGGAATGATAAATTTAGTCATGCAACAACATTAACAGCAAATATAATACAAATCT
ATCTTTTAAAAGTTTGTATTGCTAGCTTGGTGGTTATAGCATGAGTGAAACACACGATCCC (358).
```

**Figura 23. Secuencia de *Rickettsia felis* obtenida en el presente estudio.**

A la vista de los resultados obtenidos, se confirma lo que ya apuntaron otros autores como La y col. (2002) y Parola (2011) siendo *C. felis* el principal reservorio y vector de *R. felis*. La reemergencia de este patógeno podría estar asociada al carácter cosmopolita de esta especie de sifonáptero.

Por otra parte, estos resultados confirman la presencia de este patógeno en zonas geográficas del sur de España, con una prevalencia respecto al total de muestras tomadas de un 5 %, dato semejante al recogido en el estudio de Bernabeu-Wittel y col. (2006) cuya prevalencia observada fue de un 6,5 %.

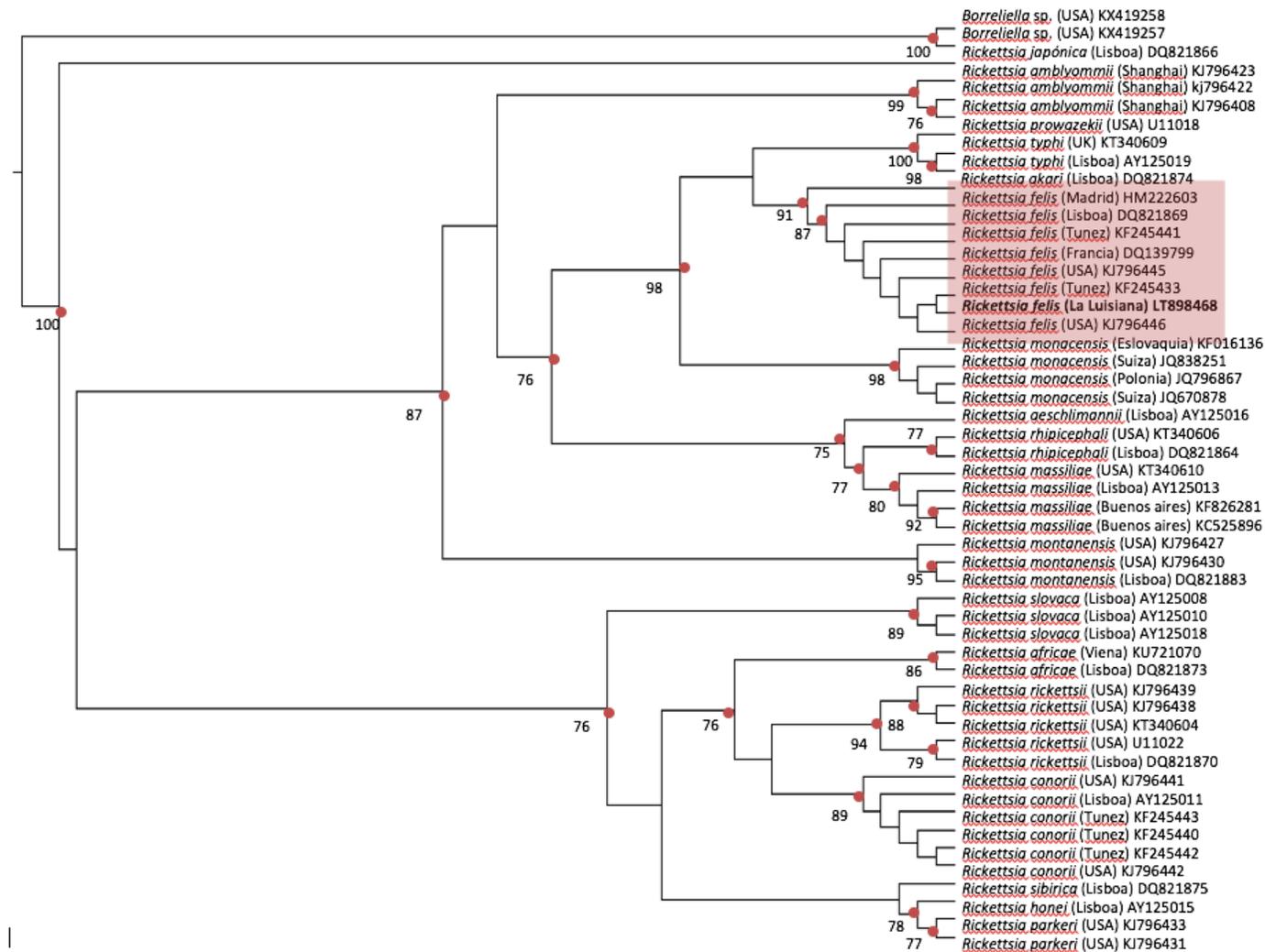


Figura 24. Árbol filogenético de *Rickettsia* sp. de diferentes zonas geográficas basadas en el espaciador interno 23S-5S. ML. Valores de bootstrap. < 70 no mostrados.

## 5. CONCLUSIONES.

1. Tras los estudios morfológicos llevados a cabo en los sifonápteros aislados de *Canis lupus familiaris* de distintas zonas geográficas de Andalucía, podemos concluir que todos pertenecen a la especie *C. felis*.
2. Entre los caracteres morfológicos analizados, concluimos que el número de espinas presentes en el metepisternito y el número de muescas o codos en la tibia III no muestran utilidad taxonómica para la diferenciación específica del género *Ctenocephalides*.
3. Tras los estudios biométricos realizados, concluimos que no existen diferencias destacables entre los individuos procedentes de diferentes localidades de Sevilla y Cádiz.
4. Los estudios basados en la aplicación de técnicas moleculares para la detección de patógenos en *Ctenocephalides felis*, indican la ausencia de *Bartonella* sp. en los distintos individuos de esta especie procedentes de distintas localidades geográficas. Por otro lado, se ha detectado, secuenciado e identificado *Wolbachia pipientis* y *Rickettsia felis* en esta especie de sifonáptero.

## 6. BIBLIOGRAFÍA.

- Alamán Valtierra M, Simón Valencia C, Fuertes Negro H, Unzueta Galarza A, Flores Somarriba B, Halaihel Kassab N. Epidemiología molecular de *Bartonella henselae* en gatos callejeros y de albergue en Zaragoza, España. Rev Esp Salud Pública. 2016; 90: 1-11.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990; 215: 403-410.
- Azad FA, Radulovic S, James A, Higgins BH, Noden, Jill MT. Flea-borne Rickettsioses: Ecologic Considerations. Emerg Infect Dis. 1997; 3: 319-327.
- Beaucournu JC, Launay H. Les puces (Siphonaptera) de France et du Bassin méditerranéen occidental. Féd Franc Soc Sci Nat. 1990; 548.
- Beaucournu JC, Ménier K. La genre *Ctenocephalides* Stiles et Collins, 1930 (Siphonaptera, Pulicidae). Parasite. 1998; 5: 3-16.
- Beaucournu JC, Gómez- López MS. Orden Siphonaptera. Rev Idea-SEA. 2015; 61: 1-11.
- Bernabeu- Wittel M, Del toro MD, Nogueras M, Cardeñosa N, Márquez FJ, Segura F et al. Seroepidemiological study of *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi*, and *Rickettsia conorii* infection among the population of southern Spain. European Journal of Clin Microbiol. 2006; 25: 375.
- Breitschwerdt EB, Kordich DL. Bartonella infection in animals: carriership, reservoir potencial, pathogenicity, and zoonotic potencial for human infection. Clin Microbiol Rev. 2000; 13: 428-38.
- Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB, Kasten RW, Vayssier-Taussant M, Birtles RJ, Koehler JE, Dehio C. Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. Vet Res. 2009; 40: 29.
- Compton SM, Maggi RG, Trull CL, Mascarelli PE, Mozayeni BR, Breitschwerdt EB. Infection with Hemotropic *Mycoplasma* Species in Patients with or without Extensive Arthropod or Animal Contact. J clinic Microbiol. 2013; 51: 3237-3241.
- Cordaux R, Bouchon D, Grève P. The impact of endosymbionts on the evolution of host sex- determination mechanisms. Trends Genet. 2011; 27: 332-341.
- Cordero CM, Rojo-Vazquez FA. Parasitología veterinaria. 1ra edición. España. McGraw-Hill-Interamericana; 1999.

- Dobler G, Pfeffer M. Fleas as parasites of the family Canidae. *Parasites and Vectors*. 2011; 18: 139.
- Durden LA, Traub R. *Medical and veterinary entomology*. 2nd edition. USA. Ed Elsevier Science; 2002.
- Espaine L, Cartas LO, Demedio J. *Enfermedades parasitarias*. 1ra edición. La Habana. Editorial "Félix Varela"; 1996.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the Bootstrap. *Evolution*. 1985; 39: 783-791.
- Gil H, García Esteban C, Barandika JF, Peig J, Toledo A, Escudero R, Jado I, Rodríguez-Vargas M, García-Amil C, Lobo B, Roales P, Rodríguez-Moreno I, Olmeda AS. Variability of Bartonella genotypes among small mammals in Spain. *Appl Environ Microbiol*. 2010; 76: 8062-8070.
- González E, Martínez F. Consecuencias evolutivas y biológicas causadas por bacterias del género *Wolbachia* en artrópodos. *S.E.A.* 2010; 46: 189–202.
- Gorham CH, Fang QQ, Durden LA. Wolbachia endosymbionts in fleas (Siphonaptera). *J Parasitol*. 2003; 89: 283-289.
- Hendrix CM. *Diagnóstico Parasitológico Veterinario* 2da. Ed. Harcourt Brack. EUA; 1999.
- Heukelbach J, Costa AM, Wilcke T, Mencke N, Feldmejer H. The animal reservoir of *Tunga penetrans* in severely affected communities of north-east Brazil. *Med Vet Entomol*. 2004; 18: 329- 335.
- Jado I, R. Escudero H, Gil I, Jiménez-Alonso R, Sousa AL, García-Pérez M, Rodríguez-Vargas B, Lobo, Anda P. Molecular method for identification of *Rickettsia* species in clinical and environmental samples. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 4572–4576.
- Jian P, Zhang X, Ruo DL, Zhong QW, Jing C. A human case of zoonotic dog tapeworm, *Dipylidium caninum* (Eucestoda: Dilepidiidae), in China. *Korean J Parasitol*. 2017; 55: 61-64.
- La SB, Meconi S, Fenollar F, Rolain JM, Roux V, Raoult D. Emended description of *Rickettsia felis* (Bouyer et al. 2001), a temperature-dependent cultured bacterium. *Int J of Syst and Evolut Microbiol*. 2002; 52: 2035-2041.
- Lane RP, Crosskey, RW. *Medical insects and arachnids*. Ed. Chapman & Hall. 1993; 529-575.
- Lewis RE. Notes on the geographical distribution and host preferences in the order Siphonaptera. Part 6. *J of Medical Entomol*. 1993; 11: 658-676.

- Linardi MP, Santos J. *Ctenocephalides felis felis* vs. *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae): Some issues in correctly identify these species. Rev Bras Parasitol. 2012; 21: 345-354.
- Lo N, Paraskevopoulos C, Bourtzis K, O'Neil SL, Werren JH, Bordenstein SR, Bandi C. Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. Int J Syst Evol Microbiol. 2007; 57: 654-657.
- Marrugal A, Cutillas C, Callejón R, De Rojas M, Halajian A. Morphological, biometrical and molecular characterization of *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* isolated from dogs from different geographical regions. Parasitol Res. 2013; 112: 2289-2298.
- Marshall AG. The sex ratio in ectoparasitic insects. 1981; 6: 155-174.
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods. Enzymol. 1987; 155: 335-350.
- Oteo JA, Portillo A, Portero F, Zavala-Castro J, Venzal JM, Labruna MB. 'Candidatus Rickettsia aseboensis' and *Wolbachia* spp. in *Ctenocephalides felis* and *Pulex irritans* fleas removed from dogs in Ecuador. Parasit Vectors. 2014; 7: 455.
- Parola P. Rickettsia felis: from a rare disease in the USA to a common cause of fever in sub-Saharan Africa. Unité de Recherche en Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes (URMITE) 2011; 17: 996-1000.
- Perry RD, Fetherston JD. Yersinia pestis- etiologic agent of plague. Clin Microbiol Rev. 1997; 10: 35-66.
- Rodriguero SM. *Wolbachia*, una pandemia con posibilidades. Rev Soc Entomol Argent. 2013; 72: 3-4.
- Rolain JM, Franc M, Davoust B, Raoult D. Molecular Detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in Cat Fleas. Emerg infect dis. 2003; 9: 339-342.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Hom GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 1988; 239: 487-491.
- Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning. 3rd Ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- Segoli M, Hoffmann AA, Lloyd J, Omodei GJ, Ritchie SA. The Effect of Virus-Blocking *Wolbachia* on Male Competitiveness of the Dengue Vector Mosquito, *Aedes aegypti*. PLoS Negl Trop Dis. 2014; 8: 3294.

- Slatko BE, Luck AN, Dobson SL, Foster JM. *Wolbachia* endosymbionts and human disease control. *Mol Biochem Parasitol*. 2014; 195: 88–95.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. Mega 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 2011; 28: 2731-2739.
- Tay ST. *Wolbachia* endosymbionts, *Rickettsia felis* and *Bartonella* species, in *Ctenocephalides felis* fleas in a tropical region. *Tropical Infectious Diseases Research and Education Centre, Department of Medical Microbiolog*. 2013; 38: 200-201.
- Urquhart GM, Armour J, Duncan DH, Dunn AM, Jennings FW. *Veterinary Parasitology*. U.K. Blackwell Science; 1996.
- Werren JH, Baldo L, Clark ME. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol*. 2008; 6: 741-51.
- Zurita A, Gutiérrez SG, Cutillas C. Infection rates of *Wolbachia* sp. and *Bartonella* sp. in different populations of fleas. *Parasitol Res*. 2016; 73: 704-1.





